OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マクロアクチュエータを用いた On-Chip 細胞マニピュレーション
Author(s)	溝上, 浩司
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69564
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

マクロアクチュエータを用いた On-Chip 細胞マニピュレーション

溝上　浩司

2017 年 12 月

大阪大学大学院工学研究科
機械工学専攻

論文要旨

赤血球の大きさは6〜8μmであるため，毛細血管を通過する際には，自分自身の形を30%程度変形させる必要がある．したがって，赤血球が変形能を失うことは，極細毛細血管内での赤血球の通過抵抗が増大することを意味し，結果的に心臓の負担増に繋がる．このように赤血球がその変形能を失った時点で生命を維持し続けること自体困難になる．赤血球変形能を知る意義がここにある．このような背景を踏まえた上で，本論文では，最新のメカトロニクス技術を駆使して On Chip 上で赤血球マニピュレーションを行い，バイオサイエンス分野に新しい発見をもたらすための基礎技術の研究を行うことを目的としている．

この目的に対して本論文では特に以下の疑問に対する答えを模索する．マイクロ流路を用いた赤血球駆動系の伝達関数はどのように表現することができるのだろうか，実システムで赤血球 1 個分の水柱ヘッドで駆動することができるのだろうか，さらに赤血球はどのくらいの時間スケールで静止させ続けることができるのだろうか．これらの疑問点について，8章に分けて研究成果をまとめている．各章の中身を要約すると以下のとおり．

第1章「序論」では，背景，各章の概要をまとめ，論文構成まで言及している．第2章「従来研究」では従来研究を整理し，本論文ではマイクロ流路を用いて赤血球を能動的に操る方法に特化することを説明している．第3章「PZTに準拠したOn-Chip赤血球マニピュレーション」では関数発生器を使って PZT に正確な正弦入力を印加し，マイクロ流路内の流体の動きをマイクロビーズをマーカーとして高速カメラで可視化することにより 300Hz までのマイクロ流路の入出力伝達特性を実験的に確認している．第 4 章「マイクロ流路高周波数伝達特性計測に向けて」では，PZT へ正弦入力を印加し，3000Hz までの伝達特性計測に成功している．第 5 章「干渉型ハイブリッドアクチュエーション」では，長時間赤血球ローディングを意識し，ドリフト流補償用の重力差動型アクチュエータと PZT を組み合わせた干渉型ハイブリッド細胞アクチュエータを提案し，その設計コンセプトを示すとともに，実験的に 30 分以上のローディングを実現することに成功している．第 6 章「同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーション」では，分解能100mPaの圧力制御を目指し，同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーションシステムを提案し，100mPa 分解能圧力制御が実現できることを実験的に検証している．第 7 章「考察」では，マイクロ流路の硬さと入出力特性

の関係について考察している．第 8 章「まとめ」では本論文を総括するとともに今後の研究展望についても整理している．

Contents

1 序論 1
1.1 背景 1
1.2 PZT に基づく On-Chip 赤血球マニピュレーション [22] 3
1.3 マイクロ流路高周波数伝達特性計測に向けて [21], [42] 4
1.4 干渉型ハイブリッドアクチュエーション [19], [23] 4
1.5 同相ノイズ除去型重力差動式細胞マニピュレーション [20] 5
1.6 考察[37] 5
1.7 学術的意義 5
1.8 論文の構成 7
2 従来研究 9
2.1 直接法と間接法 9
2.2 受動方式 9
2.3 能動方式 10
3 PZT に準拠した On-Chip 赤血球マニピュレーション 12
3.1 はじめに 12
3.2 モデリング[22] 15
3.3 実験装置 16
3.4 予備実験 19
3.5 ゲイン特性と位相特性の実験結果 21
3.6 考察 22
3.7 あとがき 23
4 マイクロ流路高周波数伝達特性計測に向けて 24
4.1 はじめに 24
4.2 実験装置 24
4.3 実験結果 26

4.4 あとがき 29
5 干渉型ハイブリッドアクチュエーション 30
5.1 はじめに 30
5.2 従来研究 32
5.3 新しいアクチュエーションシステムへのニーズ 32
5.4 干渉型ハイブリッドアクチュエーション 34
5.5 実験装置 36
5.6 実験手順 38
5.7 実験結果 38
5.8 考察 41
5.9 あとがき 43
6 同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーション 45
6.1 はじめに 45
6.2 従来研究 48
6.3 同相ノイズ除去型重力差動型圧力制御システム 48
6.4 実験 50
6.5 考察 57
6.6 あとがき 57
7 考察 59
8 まとめ 63
参考文献 66
付録 A 72
本博士論文に直接関連した研究業績 74
査読付きジャーナル論文 74
査読付き国際会議論文 74
国内学会講演論文 75
その他の業績 76

査読付きジャーナル論文 76
査読付き国際会議論文 76
国内学会講演論文 76
特許 77
解説 78
受賞 78
謝辞 79

1　序論

1.1　背景

血液成分の約 55%は血漿で 45%は血球である．赤血球，白血球，血小板といった血球のうち 95%近くは赤血球が占めている．赤血球は骨髄で生成され，寿命は約 120 日（4 か月）と言われている．運動量にも依存するが赤血球は一日に約 5000 回体内を循環している．これは約 20 秒で一回体内を循環している勘定になる．赤血球は肺胞で酸素を取り込み，心臓から大動脈，直径2〜5μmの毛細血管を介して，各細胞に酸素を送り，それと引き換えに二酸化炭素を取り込み肺まで運ぶ重要な任務を担っている．赤血球の大きさは6〜8μmであるため，毛細血管を通過する際には，自分自身の形を30%程度変形させる必要がある．したがって，赤血球が変形能を失うことは，極細毛細血管内での赤血球の通過抵抗が増大することを意味し，結果的に心臓の負担増に繋がる．このように赤血球がその変形能を失った時点で生命を維持し続けること自体困難になる．赤血球変形能を知る意義がここにある．近年，赤血球の変形能評価の重要性がさけばれるようになったのはこのような背景による[24].

赤血球の変形能は細胞の硬さと密接に連動している．一般に硬い赤血球は変形能が低く，逆に柔らかい赤血球は変形能が高い．したがって赤血球の変形能評価と赤血球の硬さ評価とは密接な関係がある．ただし赤血球の変形能には赤血球の液体部分の粘性の影響も関与するため，厳密な意味では，赤血球の変形能評価は赤血球の機械インピーダンスを評価することと等価とみなすことができる．機械インピーダンスは一般にバネ，ダンパー，質量からなり，それぞれ変位，速度，加速度を力に変換する機械要素である．この定義からわかるように機械インピーダンスは能動的な動きまたは力を対象物に与えない限り計測することはできない．例えば，対象物のバネ定数は，剛体棒で対象物に既知変位を加え，そのときの反力を計測してはじめて求められる．ただし，赤血球の機械インピーダンスを考える場合，一般に質量は無視できる程度に小さいため，バネとダンパーだけ考慮すれば十分である．

次に赤血球の硬さ評価法について考えてみよう．郡ら[18]はマイクロピペットを用いて細胞のヤング率を評価する方法を提案している．細胞をマイクロピペットの吸引口に接触させた状態からマイクロピペットの内部を負圧にして細胞の一部を吸引し，そのときの内圧，吸引部長さ，及び吸引部の曲率の関係から細胞のヤング率を評価し

ている．この方法は原理的に赤血球にも応用可能である．また橋本ら[10]は血液を円筒版に入れて回転させると，赤血球は回転流に伴って発生するせん断応力によって楕円形状になり，その長軸・短軸比から硬さを評価する方法を提案している．一方，細胞表面の硬さを評価する強力なツールとして，原子間力顕微鏡がある．弾性針の変位と接触点に作用する接触力から細胞表面付近のヤング率を評価することができる．ただし，これらの方法はいずれもスループットが低く，数分で 3 桁のサンプルを得ることは困難である．これに対し，例えば幅 3μm のマイクロ流路内に赤血球を流したとき，同じ大きさの赤血球であれば，柔らかいほどマイクロ流路内をより素早く通過する．つまり赤血球の硬さはマイクロ流路通過時間によって間接的に評価することができる．マイクロ流路を用いて評価する方法の最大の利点は高いスループットが期待できる点である．Hirose ら[13]はこの方法で一秒間に 400 個の赤血球の硬さ評価に成功している．さらに Tsai ら[39], [41]は，マイクロ流路を並列に配置することにより，規格化されたマイクロ流路通過速度と規格化された赤血球変形度の間に 0.9 以上の高い相関が出ることを見出している．なお，本研究の一部は大阪大学医学研究科との共同研究であり，赤血球の使用は倫理委員会の承認を得て行っているものであることを付記しておく．

一方，マイクロ流路を用いて赤血球の硬さを評価する場合，大きく二つの方向性が考えられる．一つはマイクロ流路両端に一定の圧力差を与え，赤血球がマイクロ流路内を通過する時間（または通過速度）を観察する方法である．この方法はマイクロ流路両端の圧力差さえ正確に維持できれば，測定条件が保証される．これに対し，近年，メカトロニクス技術を駆使してマイクロ流路両端の圧力差を積極的に変え，赤血球を能動的に操ることによって，赤血球の力学特性を幅広く調べようとする研究が行われるようになった．Fukui[8]らや Sakuma ら[32]は，PZT を用いて，赤血球を幅 3μm の狭窄部に対して往復運動させることによって，赤血球にストレスを与え，数百回から数千回の往復運動によって赤血球が回復能力を失うストレス効果を世界ではじめて発表している．Monzawa ら[25]はテスト部で使用する血液とアクチュエータ部の作動流体が混ざらないようにするために物理的に隔壁を設けつつ，圧力だけが伝わるように配慮した On-Chip Actuation Transmitter を提案している．Sakuma ら[31]は，マイクロ流路の伝達特性を実験的に調べ，PDMS チップに内在している弾性が見かけ上の減速効果を生み出し，0.24μm の細胞位置決め精度が実現できていることを突き止めている．ただし閉ループゲイン特性で共振挙動が見えていたにも関わらず，解析モデルでは質量が考慮されていないため，実験結果と解析モデルの結果に食い違いが生じている．さらにアクチュエータの運動を直接観察しているわけではなく，PC 内で作成された正弦波形に対して DA 変換器を介してアクチュエータへ印加しているため，サンプリング

周期 1kHz の壁により，周波数が高くなったときに正確な正弦波信号がアクチュエータに入力されていないという問題を含んでいた．例えば，100Hz の波形は離散的に 10 点の印加信号で生成されるが，200Hz の波形はわずか 5 点でしか生成されないため，入力信号自体，すでに正弦波からずれた波形になる．そのため正確なボード線図を実験的に得ることが困難であった．このようにマイクロ流路を用いた能動的細胞マニピュレーションには以下のように未解決問題や興味深い疑問がいくつかある．

1．高速化：PDMS マイクロ流路の開ループ伝達特性を 3000Hz まで計測しようとした場合，どのような点に留意して計測システムを構築する必要があるのか？さらにどのような特性が見られるのか？
2．高分解能化：細胞の精密マニピュレーションは混在するノイズの中でどこまで向上させることができるのか？

これらの疑問について考察することは，マイクロ流路を用いて細胞の力学特性を知る上で必要不可欠である．以上が本研究を始めるに至った背景である．

1.2 PZT に基づく ON-CHIP 赤血球マニピュレーション [22]

1.1 の背景を踏まえ，本研究では PDMS マイクロ流路の開ループ伝達特性について考察することからはじめる．はじめに，マイクロ流路内流体の質量の影響も考慮したモデルに対して，入出力伝達関数を導出している．導出された伝達関数は，周波数無限大で，振幅ゲインはゼロに収束せず一定値に収束するという結果が得られた．この現象は高周波数では，PDMS マイクロチップの仮想減速器効果がなくなるという興味深い結果につながる．実験では，これまでのように PC 内で生成された波形を DA 変換器を介して，PZT に印加するのではなく，外部波形発生器を用いてアナログ波形を直接 PZT に入力する方式を採用している．これにより，印加周波数が高くなっても正弦波入力波形が維持できるという利点が担保できる．一方，開ループで実験を行うと，圧力ドリフトによって赤血球が視野外に出てしまうという問題が発生する．この問題を解消するため，マーカーとしてマイクロビーズを用い，ビーズに介在する直流成分はフィルターで取り除き，印加周波数成分だけに着目する方法を採用している．その結果，100Hz まで位相遅れはほぼ 90 度，ゲイン特性は-20dB/dec という典型的は積分特性が得られることを実験的に明らかにしている．赤血球位置フィードバック制御における周波数特性を向上させる手段として，PDMS チップの剛性を上げ，共振周波数を上げることが重要であることを示唆している．

1.3 マイクロ流路高周波数伝達特性計測に向けて [21], [42]

3000Hz レベルの正弦波入力を PDMS マイクロチップに入力した場合に，入出力伝達特性はどのようになるのだろうか？この素朴な疑問に答えるため，入出力関係を求め FFT を駆使して，3000Hz までゲイン周波数特性を調べた結果，2000Hz, 3000Hz あたりでマイクロビーズの振幅が数 μm と小さくなり，ゲイン特性にばらつきが見られたものの，全体的にはマイクロ流路出入り口間の圧力差がマイクロ流路内平均速度に比例する Hagen-Poiseuille 流に準じて，マイクロビーズの振幅が周波数に反比例して減少するという簡単な基本特性を確認することに成功している．

1.4 干渉型ハイブリッドアクチュエーション [19], [23]

赤血球の機械インピーダンスの計測の上で，バネはマイクロ流路の細胞通過時間で評価することができるが，ダンパー計測は細胞形状の時間変化を観察する必要がある．Ito ら[27]は，ダンパーの影響を引き出すために，赤血球を狭窄部で一定時間ローディングしてから狭窄部外に開放した際の細胞形状の時間的変化からバネとダンパーを評価する方法を提案し，赤血球の機械インピーダンスがローディング時間によって激変することを報告している．この実験では，ローディング時間を最大 10 分程度に設定されるため，ドリフト流が存在する中で長時間赤血球位置保持が容易に行えるシステムの必要性が指摘されている．理想的にはマイクロ流路出入り口間の圧力差が完全にゼロになれば，マイクロ流路内の流れは起こらないはずである．ところが PDMS マイクロ流体チップやアクチュエータとチップを接続するチューブ等に介在する弾性要素のため，圧力を完全に大気開放したとしても，数 μm / 秒程度のマイクロ流路内の流れはなかなか止めることが困難である．逆に言うと，狭窄部で赤血球のローディングを行っている間中，位置フィードバック制御を行っていないと，ローディングを維持し続けることはできない．細胞マニピュレーションでは高応答性を重視して，PZT が用いられることが多い．PZT は 10kHz オーダの応答性を実現している一方で，ストロークは 40 μmときわめて小さい．このため，赤血球を長時間ローディングしているとストロークが飽和域に達し，赤血球を逃がしてしまうことがしばしば起こっていた．そこで，PZT に加え，ドリフト流に対処するためにストロークの大きいスライダを組み込んだハイブリッドアクチュエータを考案している．このアクチュエータシステムは，実質的には重力差動式アクチュエータの PDMS マイクロ流路入り口前に三方分岐管を介して PZT が組み込まれた形になっている．したがって，マイクロ流路内の流れは，

両アクチュエータの出力が影響し合う干渉型アクチュエータシステムになっている．ただし，ドリフト流の影響は小さいため，基本的には PZT が主で，スライダはドリフト流補償だけに使われるよう配管径が設計される．このハイブリッドアクチュエータシステムを用いることで，ローディング時間を 30 分以上設定することに成功している．

1.5 同相ノイズ除去型重力差動式細胞マニピュレーション[20]

マイクロ流路内の細胞マニピュレーションにおいて細胞の速度分解能がどこまで上げることができるのだろうか？マイクロ流路内での細胞は基本的に流路出入り口間の圧力差によって駆動されるのは自明である．そうだとすると，圧力センサを設置し，圧力フィードバックすれば，原理的には精密な速度制御や位置制御ができるはずである．ところが，圧力センサに介在するノイズによって，安定したフィードバック制御を行うことは難しい．そこで，液体の入った容器を二つ用意し，一つは高さ固定，もう一つはスライダで重力方向に移動できるように設置し，両者の間にマイクロ流路を接続すると，マイクロ流路出入り口間の圧力差は，スライダの動きによって微調整できる．この方式がいわゆる重力差動型細胞マニピュレーションである．この方式は，圧力センサが不要であるためセンサノイズの問題からは完全に開放されるものの，スライダが駆動される際のノイズが介在する場合がある．この問題を解消するため，高さ固定の容器もスライダと同じテーブルに乗せることにより，可動容器と固定容器の両方にノイズが加わるようにして，差動機構により同相のノイズを除去するという方法を導入し，100mPa 分解能（細胞 1 個分の水柱分）を実現することに成功している．

1.6 考察[37]

マイクロチップの硬さが入出力特性に及ぼす影響について二種類の硬さを有する PDMS マイクロ流体チップを使って入出力伝達特性について実験的に調べ，硬いチップでは共振点周波数が高くなることを確認している．さらに第 6 章で開発された高分解能細胞マニピュレーションシステムを用いて赤血球のヤング率推定を行い，数パスカルから数十パスカルの範囲に収まることを示している．

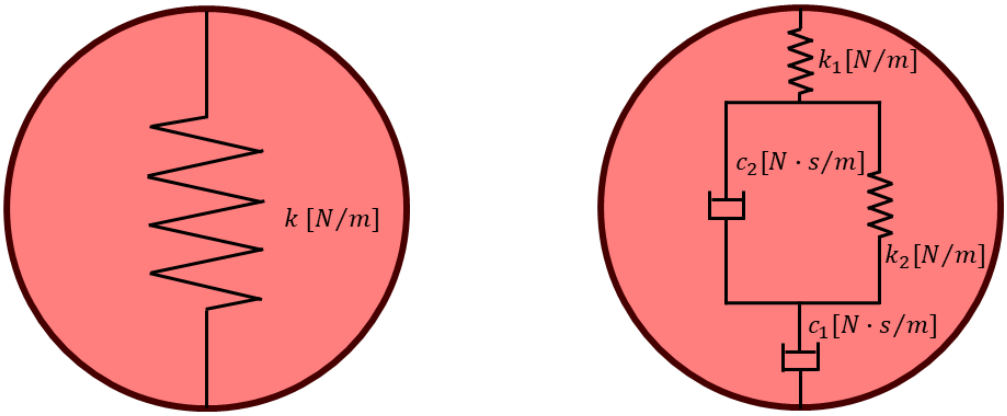
1.7 学術的意義

本研究の究極的目的は赤血球の機械インピーダンスを[N], [m], [s]の次元付きで計測することである．この目的が達成できれば，他の研究者の研究成果と同じ土俵で結果

を比較することができる．このような視点で本研究の学術的意義をまとめると以下のようになる．

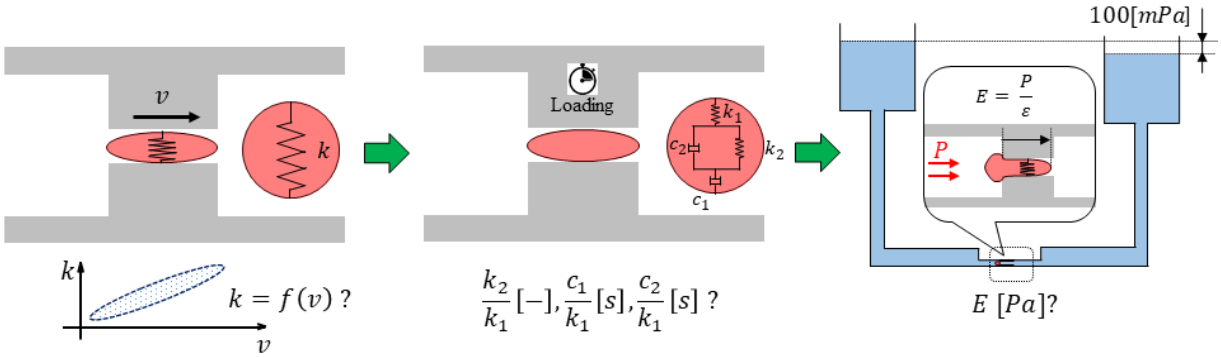
赤血球は Fig. 1.1(a), (b)のようなバネ・ダンパーを用いてモデル化することができる．ここで，Fig. 1.1(a)は単純バネモデルで，Fig. 1.1(b)は二つのバネ要素と二つのダンパー要素を使ったモデルである．マイクロ流路狭窄部を通過させる場合，硬い赤血球に比べて柔らかい赤血球の方が通過速度は速くなる．この関係は Fig.1.2(a)の下図で示されるように硬さと通過速度 v の間に強い正の相関があることを示唆している．ただし，この方法では [m]/[s] の次元しかとれないため，バネや弾性に欠かせない力[N]の次元が組み込めない．3 章，4 章では，硬さと通過速度 v の間に強い正の相関が出るという性質を前提にして，マイクロ流路の入出力伝達特性を調べ，赤血球の通過速度にどのような影響がでるか考察している．一方，マイクロ流路狭窄部でローディング時間を入れると，Fig.1.2(b)のように 4 要素すべてが評価できる．5 章では 4 要素モデル同時解析に向け，赤血球のローディング時間を十分確保するための基礎技術を構築しようとしている．ただし，赤血球の変形に着目する限り，例えばk_1を基準とした相対的大きさ$k_2/k_1, c_1/k_1, c_2/k_1$等が評価できるものの，バネやダンパーに欠かせない力[N]の次元を組み込むことはできない．

これに対し，6 章では 100mPa という細胞 1 個分の水柱圧力相当の分解能を有するため，機械インピーダンスを評価するときに欠かせない力[N]の次元を組み込むことが可能になる．6 章で開発したシステムを使って赤血球のヤング率[Pa]のオーダが見積もることができることを示し，簡単なシステムで赤血球評価に次元を組み込むという新たな学術分野を切り開くことにも成功している．



(a) Single spring model　　(b) Four elements model

Figure 1.1. The model of red blood cell.



(a) Single spring model without dimension　(b) Multiple spring and damper model without dimension　(c) Single spring model with dimension

Figure 1.2. The evaluation on mechanical impedance of RBC. (a) Single spring without dimension. (b) Multiple springs and dampers without dimension. (c) Single spring with dimension.

1.8　論文の構成

第 1 章では背景，各章の概要をまとめ，論文構成まで言及している．第 2 章では従来研究を整理し，第 3 章では PZT に準拠した On-Chip 赤血球マニピュレーションにおける入出力伝達特性について実験的に考察を行っている．第 4 章では，入力周波数を 3000Hz にまで上げた際の入出力ゲイン特性について実験的に調べている．第 5 章では，長時間赤血球ローディングを意識し，ドリフト流補償用の重力差動型アクチュエータと高応答細胞操作用 PZT を組み合わせた干渉型ハイブリッドアクチュエータを提案し，

その設計コンセプトを示すとともに有効性を実験的に検証している．第 6 章では 100mPa 分解能圧力制御を目指し，同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーションの提案および実験的検証について記載している．第 7 章ではシリコンチューブ長さと，マイクロチップの硬さが入出力特性に及ぼす影響ついて考察している．第 8 章で本研究を総括している．

2　従来研究

2.1　直接法と間接法

赤血球変形能計測に関する研究は大きく直接法[5], [4], [7], [9], [11], [43], [46]と間接法に大別できる．直接法とは力センサ付きプローブを赤血球に直接押し当て，そのときの変形をビジョンやレーザーセンサ等で計測し，力/変形特性から硬さや粘性を評価する方法である．原子間力顕微鏡を用いた硬さ計測はその一例である．マイクロピペット吸引口に接触させた状態からマイクロピペットの内部を負圧にして細胞の一部を吸引し，そのときの内圧，吸引部長さ，及び吸引部の曲率の関係から細胞のヤング率を評価する方法も圧力/変形特性を用いているという意味で直接法に分類することができよう．繰り返しになるが直接法は厳密性という担保は確保できるが，一般にスループットは低い．唯一の例外として，マイクロ流路内に力センサを組み込んで，細胞をトラップした状態で力を印加し，硬さ計測を行った例はあるが，ヤング率数 kPa オーダの赤血球に対して応用された研究は知見しない．一方，間接法は，力を直接計測するのではなく，赤血球に同一幾何学的拘束条件下で強制変位を与え，そのときの変形の時間的変化を計測することで硬さや粘性を評価する方法である．例えば，マイクロ流路内にそれより直径が大きい赤血球を通過させると，その変形度合いと赤血球の硬さに応じて壁面とのせん断応力が変化し，結果的に マイクロ流路内の通過時間が変化する．つまり赤血球の硬さは通過時間の関数になる． Figs. 2.1, 2.2 はそれぞれマイクロ流路内を移動する赤血球の挙動を示した連続写真，及び赤血球位置と時間との関係を示した図である[39], [40]．例えば，同一直径かつ同一粘度を有する赤血球であれば，通過時間が長い程，硬く，変形能は悪いと言える．間接法では硬さや粘性の絶対値は得ることはできない反面，力センサが不要，高速計測が可能といった利点を有している．本研究は，高スループットが期待できるマイクロ流路を用いた間接評価法に絞り込む．

2.2　受動方式

一番ポピュラーな方法は，Figs. 2.1, 2.2 のようにマイクロ流路内出入り口に一定の圧力差を与え，赤血球の通過時間をオフラインカメラ等で計測する方法である．実験装置の構成としては，容器内に生理食塩水で希釈した血液を入れ，マイクロチップに対して相対的に容器を重力方向に対して高い位置で固定し，マイクロ流路内差圧を一定にして計測を行うという方法である．Ohba ら[36]は，マイクロ流路から解放された赤

血球の回復時定数により硬さを評価している．一般に硬い赤血球ほど回復時定数が小さくなる．また，Huang ら[34], Hirose ら[13], Kim ら[16]も同様なコンセプトに基づいてマイクロ流路を用いて赤血球の硬さを評価する方法を提案している．これらの研究はいずれも陽にアクチュエータを配置せずに，計測用センサだけを設置するというのが基本コンセプトである．

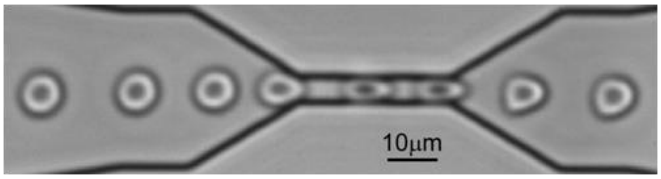


Figure 2.1. An example of cell behavior in microfluidic channel [39], [40],[41]

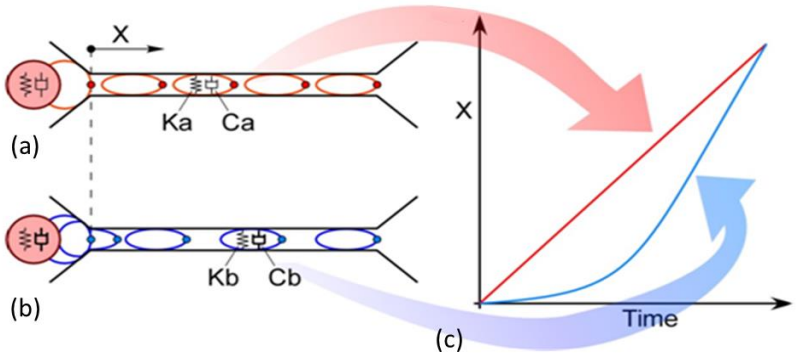


Figure 2.2. There are two cases where the passing time is same but the mechanical impedances are different ($K_a > K_b, C_a < C_b$)

2.3 能動方式

理想的な状態が長時間に渡って維持できる場合には受動方式で問題ないが，PDMS マイクロチップとチューブの接続条件やチューブ形状が微妙に変化すると，マイクロ流路内の圧力が変化し，計測条件を一定に保てなくなる．そのため近年，計測条件を維持するために，計測用センサだけでなく，マクロアクチュエータも組み込み，同一実験条件を維持するためにフィードバック制御系が組み込まれる場合が多い．このようにマクロアクチュエータを組み込んで実験条件を維持または積極的に変更する方式が能動方式である．例えば，圧力センサと PZT を用いて，マイクロチップ流入圧力が絶えず一定になるようにした状態で赤血球変形能評価試験を行うというはその一例で

ある．このように計測条件を維持するという用途だけでなく，赤血球を積極的に動かして，いままで見れなかった赤血球の新しいダイナミクスを観察するという研究が近年活発に行われるようになった．例えば，Sakuma ら[31]は，PZT とオンライン高速ビジョンを組み合わせて，赤血球を分解能 1μm，位置決め速度 10ms で操作可能なシステムを構築している．このシステムを用いて，赤血球を幅 3μm の狭窄部に対して往復運動させることによって，赤血球にストレスを与え，数百回から数千回の往復運動によって赤血球が回復能力を失うストレス効果を世界ではじめて発表している[32]．Monzawa ら[25]はテスト部で使用する血液とアクチュエータ部の作動流体が混ざらないようにするために物理的に隔壁を設け，PDMS の弾性効果によって圧力だけが伝わるように配慮した On-Chip Actuation Transmitter を提案し，血液サンプル量低減に大きく貢献している．また Sakuma らは，血球の元々の直径に対して，マイクロ流路内で長さがどれだけ伸びたかを示す伸展能とストレス試験との間に強い相関がでることを見出し，数百回から数千回のストレス試験を行わなくても，赤血球を一回だけマイクロチップの狭窄部に通すだけで，ストレス試験の結果が予測できることを示唆している．さらに Ito ら[27]は，赤血球のダンパーの影響を引き出すために，赤血球を狭窄部で一定時間ローディングしてから狭窄部外に開放した際の赤血球形状の時間的変化からバネとダンパーを評価する方法を提案し，赤血球の機械インピーダンスがローディング時間によって激変することを発見している．これらの研究結果は，いずれもオンライン高速ビジョンで赤血球の位置を実時間追跡し，その位置情報を PZT にフィードバックすることで赤血球の高速・高分解能位置決め制御が実現できるようになったことにより得られたものであり，赤血球をはじめとし，細胞の力学特性解明に向け，能動方式がキー技術を提供しつつあることを付記しておきたい．

3　PZT に準拠した ON-CHIP 赤血球マニピュレーション

3.1　はじめに

3 章では Fig. 3.1(a) のように，赤血球を次元を無視した単純バネモデルに置き換えて評価しようとしている点に留意されたい．

マイクロ流路内赤血球をマニピュレーション方法 する上で，マイクロ流路を内包するチップの入出力，すなわち伝達関数を知ることはきわめて重要である．3 章では，この問題について特に実験的に考察することを目的としている．

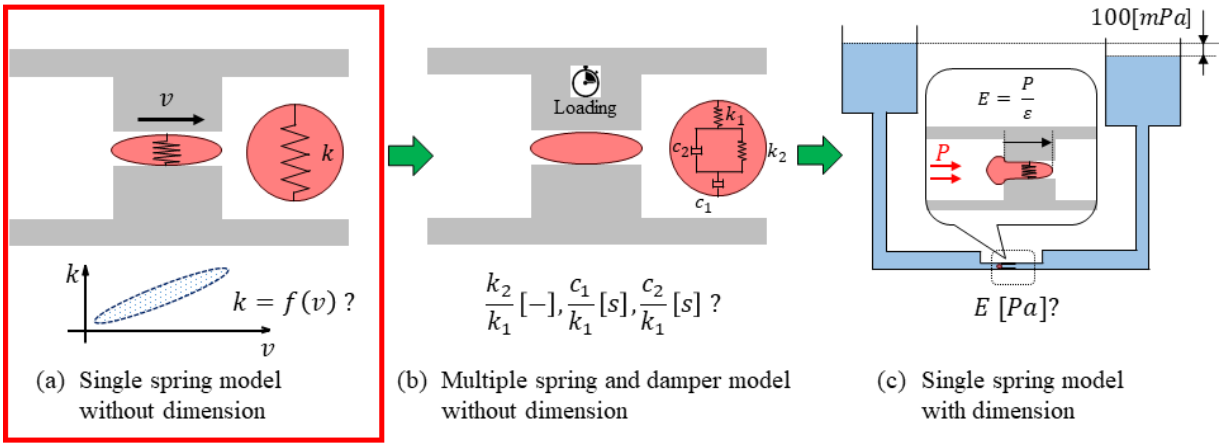


Figure 3.1. The evaluation on mechanical impedance of RBC. This chapter focuses on single spring model without dimension as shown in (a).

マイクロ流路内の赤血球をマニピュレーションする方法には，アクチュエータの設置の観点から大きく，内部設置方式と外部設置方式の二通りある．内部設置方式はアクチュエータをマイクロ流路に埋め込む方法である．この場合，アクチュエータの位置決め分解能と赤血球の位置決め分解能は，一対一に対応し，一般に高分解能が保証されるものの，赤血球がマイクロチップ内で詰まってしまった場合にはアクチュエータも一緒に廃棄されることになり，一回詰まるごとに数千円から数万円の失費になる．一方，外部設置方式はアクチュエータをマイクロ流路外に設置し，アクチュエータで圧力を発生し，流体を介してマイクロ流路内の赤血球をマニピュレーションする方法である．この際マクロアクチュエータとしてよく使われるのが PZT である．PZT は応答周波数 20kHz まで安定した動作が保証できるものが市場で容易に入手することがで

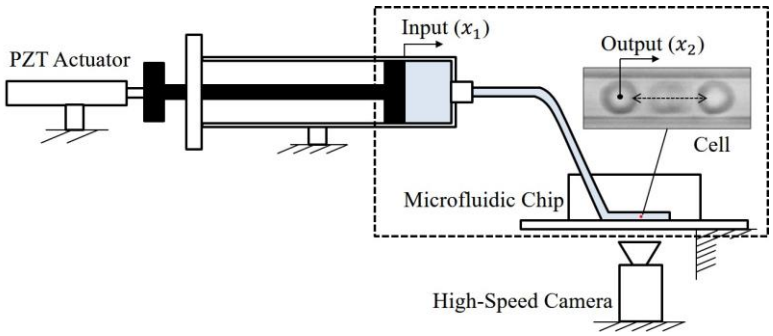


Figure 3.2. An illustrative diagram demonstrates how cell manipulation is controlled by a macro actuator outside the microfluidic chip.

きる．ただし，ヘッドの直径は数 mm から数 cm オーダであるため，マイクロチップ外部に設置せざるを得ない．外部設置方式は，流路内で赤血球が詰まった場合に，マイクロチップ（1$/個）だけ交換すればいいため，経済性の観点から圧倒的に有利である．しかも PDMS マイクロチップの弾性により圧力印加に伴ってチップが膨らむため，見かけ上の減速器を作り出し，マイクロ流路と PZT の面積比からくる 100 万倍の増速効果を補償してくれる．このような利点を配慮して，本研究ではマクロアクチュエータとして PZT を用いることを前提とする．Fig 3.2 は PZT を用いた On Chip 赤血球マニピュレーションシステムの基本構成を示す．基本的には，マイクロ流路を内包したチップ，そこに圧力を印加するためのシリンジピストン（以下シリンジと略記），シリンジを駆動するための PZT，さらに赤血球の動きを観察するための高速カメラによって構成される．実際には赤血球を拡大する顕微鏡も必要になるが，Fig 3.2 では簡単のため省略している．このようなシステムを用いてマイクロ流路内での赤血球マニピュレーション試験が行われ，周波数 130Hz，位置決め分解能 240nm まで実現されている[31]. ところがこれらの研究にはいくつか重要な点が配慮されていない．一つ目は，ゲイン特性が共振特性を示しているにも関わらず，モデルに運動部の質量が考慮されていないことである．赤血球の質量は無視できるほど小さいが，実際にはマイクロ流路内の流体と一緒にマイクロ流路壁面が動くため，高周波数領域では，慣性が無視できなくなる可能性がある．二つ目はアクチュエータへの入力波形の問題である．これまでは PZT への入力信号は PC 内で作成され，DA 変換器を介して PZT コントローラに 1kHz のサンプリングで入力されていた．そのため周波数が高くなったときに正確な正弦波信号がアクチュエータに入力されない．例えば，100Hz の波形は離散的に 10 点の印加信号で生成されるが，200Hz の波形はわずか 5 点でしか生成されないため，入力信号自体，すでに正弦波からずれた波形になる．そのため正確な入出力特性を実験的に得る

ことが困難であった．3つ目は，開ループ周波数伝達特性の計測のむつかしさにある．マイクロ流路内の赤血球の挙動はきわめて敏感で，わずかなドリフト流がのるだけで，顕微鏡下ではたちどころにカメラの画角からはずれてしまう．そのため従来研究では赤血球を実時間追跡し，その情報をアクチュエータにフィードバックする閉ループ系での周波数特性が計測されていた．

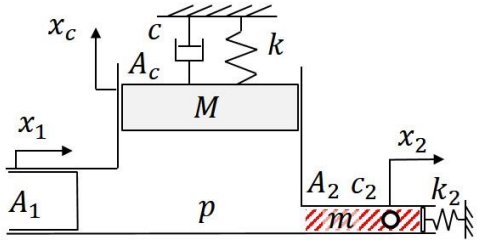


Figure 3.3. The proposed mechanical model for describing the relation between the movement between a macro actuator (x_1) and a micro object (x_2). The model describes the dashed box area shown in Fig 3.2.

このようにマイクロ流路内赤血球の開ループ伝達特性計測のむつかしさを知った上で，本論文では，マーカーとしてマイクロビーズを用いる方法を考える．マイクロビーズを用いる一番の利点は，多くのビーズをマイクロ流路内に導入することによって，多少のドリフト流が介在していてもカメラの画角内に絶えず複数のビーズが確保できる点にある．そのため，高速カメラ等で取得されたビーズの位置データに対して，適当なハイパスフィルターをかけることにより，ドリフト成分を除去した形で印加周波数成分だけ抽出でき，開ループ伝達関数を実験的に取得することができるというのが本研究での基本的なアイデアである．さらに，PZT に正確な正弦波を入力するため，PC 内で生成された正弦波を DA でサンプリング周期で離散化して，PZT コントローラに入力するのではなく，外部波形発生器によって生成されたアナログ波形を PZT コントローラに直接入力し，極力正確な正弦波入力を PZT に与えるよう配慮している．本章の構成は以下のようになっている．3.2 においてマイクロ流路内流体，及び PDMS マイクロチップ運動部の質量まで考慮して，伝達系のモデリングを行い，3.3 において実験方法，さらに 3.4 で実験結果について説明する．さらに 3.5 で実験結果とモデルとの比較および考察を行い，3.6 で本章の結果をまとめる．

3.2 モデリング[22]

Fig 3.3 にマイクロ流路内流体の挙動を議論する上での機械モデルを示す．ここでx_1及びx_2はそれぞれ入力変位（シリンジ変位）及び出力変位（赤血球変位）である．A_1とA_2はPZTアクチュエータの断面積，及びマイクロ流路の断面積であり，両者の面積比のオーダは$A_1/A_2 \sim 10^6$．また$P,\ k_1,\ c,\ c_2, m,\ A_c$及び$k_2$はそれぞれマクロ・マイクロ流路連結部の圧力，PDMSマイクロチップの弾性及び粘性，流体の等価粘性，PDMSの弾性変形に伴って運動する流体の等価質量，PDMSの弾性変形に起因した等価断面積，及び流路出口側のマイクロチップの弾性である．なおここでは赤血球は，マイクロ流路内流体と同じ速度で運動するものと仮定している．

この系に対する連続の式と運動方程式はそれぞれ以下のように定式化される．

$$A_1 x_1 = A_c x_c + A_2 x_2 \tag{3.1}$$

$$pA_c = M\,\ddot{x}_c + c\dot{x}_c + kx_c \tag{3.2}$$

$$pA_2 = m\,\ddot{x}_2 + c_2\dot{x}_2 + k_2 x_2 \tag{3.3}$$

ここで$\dot{x}_c,\ \dot{x}_2,\ \ddot{x}_c,\ \ddot{x}_2$はそれぞれ$x_c$と$x_2$を時間に対して1階微分また2階微分したもので，速度または加速度を表している．これらの式をラプラス変換して整理すると以下の伝達関数を得ることができる．なお詳細な式変形については付録 A を参照されたい．

$$\frac{X_2}{X_1} = \alpha \frac{s^2 + 2\zeta_1\omega_1 s + \omega_1^2}{s^2 + 2\zeta_2\omega_2 s + \omega_2^2} \tag{3.4}$$

ここでX_1, X_2及びsはそれぞれx_1のラプラス変換，x_2のラプラス変換,及びラプラス演算子を表している．また$\alpha,\ \zeta_1,\ \zeta_2,\ \omega_1,\ \omega_2$はそれぞれ以下のように定義されたパラメータである．

$$\alpha = \frac{A_1 M}{A_2\left[M + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 m\right]}$$

$$\zeta_1 = \frac{c}{2\sqrt{Mk}}$$

$$\omega_1 = \sqrt{\frac{k}{M}}$$

$$\zeta_2 = \frac{c + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 c_2}{2\sqrt{\left[M + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 m\right]\left[k + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 k_2\right]}}$$

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{k + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 k_2}{M + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 m}}$$

式(3.4)はシリンジピストン変位に対するマイクロ流路内流体変位の関係を表す伝達関数である．一方，シリンジピストン変位の代わりに圧力 p を入力とみなす場合には，伝達関数は式(3.3)から簡単に導出することができる．ただし，この場合にはマイクロチップ内の圧力を知る必要があり，これを直接計測することはきわめてむつかしいため，現実的な方法ではない．

3.3 実験装置

Fig 3.4(a)は実験システムの外観である．関数発生器からの信号を直接 PZT コントローラに入力することによって PZT が駆動されるため，従来方式のように PC で波形生成する方式に比べ圧倒的に正確な正弦波を生成することができる．なお波形発生器から与えられるオフセット信号と最大振幅信号はそれぞれ1V及び0.4V となっている．0.4V

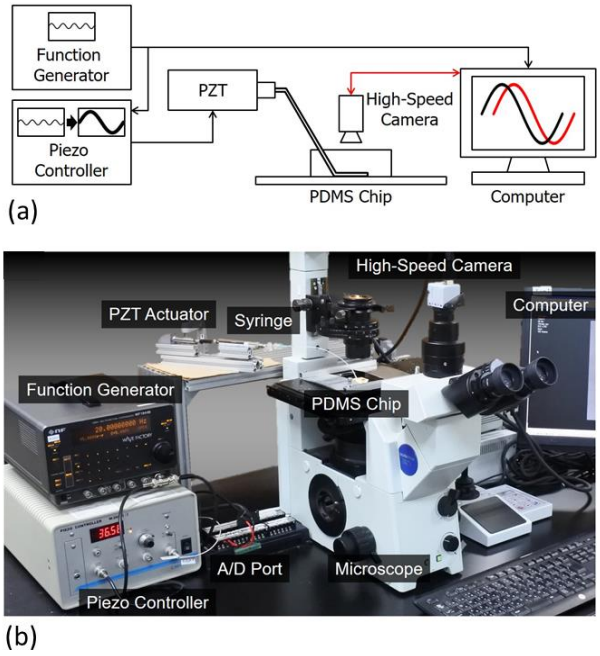


Figure 3.4. An overview of the experimental system [22]. (a) A diagram of the system setup. The motion of the PZT actuator is controlled by a sinusoidal wave generated from a function generator while the motion of microbeads is recorded by a high-speed camera. The two motions are synchronized on the computer for analysis. (b) A photo of the actual system setup.

は PZT 先端で 1.6μm の最大振幅を生成する．関数発生器からの信号は AD 変換器を介して PC にも入力され，高速カメラとの同期信号，さらに伝達関数を求める際の入力信号として使われる．なお高速カメラは PC からの指令信号に基づいて動作し，マイクロ流路内のマイクロビーズの動きが計測され，伝達関数を求める際の出力信号として利用される．なお，位相信号を取得するためには入力信号と出力信号の同期が取れていなければならない．このため，両信号とも同一 PC に同期をとりながらデータ取得されていることを強調しておきたい．

Fig 3.4(b)は実際の実験システムの外観である．実験システムはマイクロ流路を内蔵した PDMS チップ，デジタル波形発生器（WF1944B, NF Corp., Japan），PZT（PSt150/5/40, Syouei System, Co., Ltd.），PC カード(CSI-360116, Interface Co., Japan），顕微鏡(IX71, Olympus Co.)，高速カメラ (IDP, Photron Co., Japan)，及び PC により構成されている．PDMS チップは，標準的なリソグラフィプロセス[30]に準拠して製作されたフォトレジスト(SU8-3005)によってマスターを構築し，それを用いてコピィを製作している．なお PDMS チップの機械特性はコピィ作成時の PDMS と硬化剤の割合から決まる[3]．本研究では PDMS と硬化剤の比率を 1:10 で PDMS チップを製作している．マイクロ流路の高さと幅はそれぞれ 3μm 及び 100μm で設計している．マイクロビーズとして，直径 1μm のポリマービーズ(4009A,Thermo Fisher Scientific Inc.)が使われている．なお高速カメラの記録レートは 1000 frames/sec (fps)でマイクロビーズの動きを計測している．細胞の代わりにマイクロビーズを用いることにより，細胞の軟らかさや大きさの影響を極力排除できるだけでなく，直径 1μm というマイクロビーズの微小サイズにより，トレーサー数を増やすことができる．

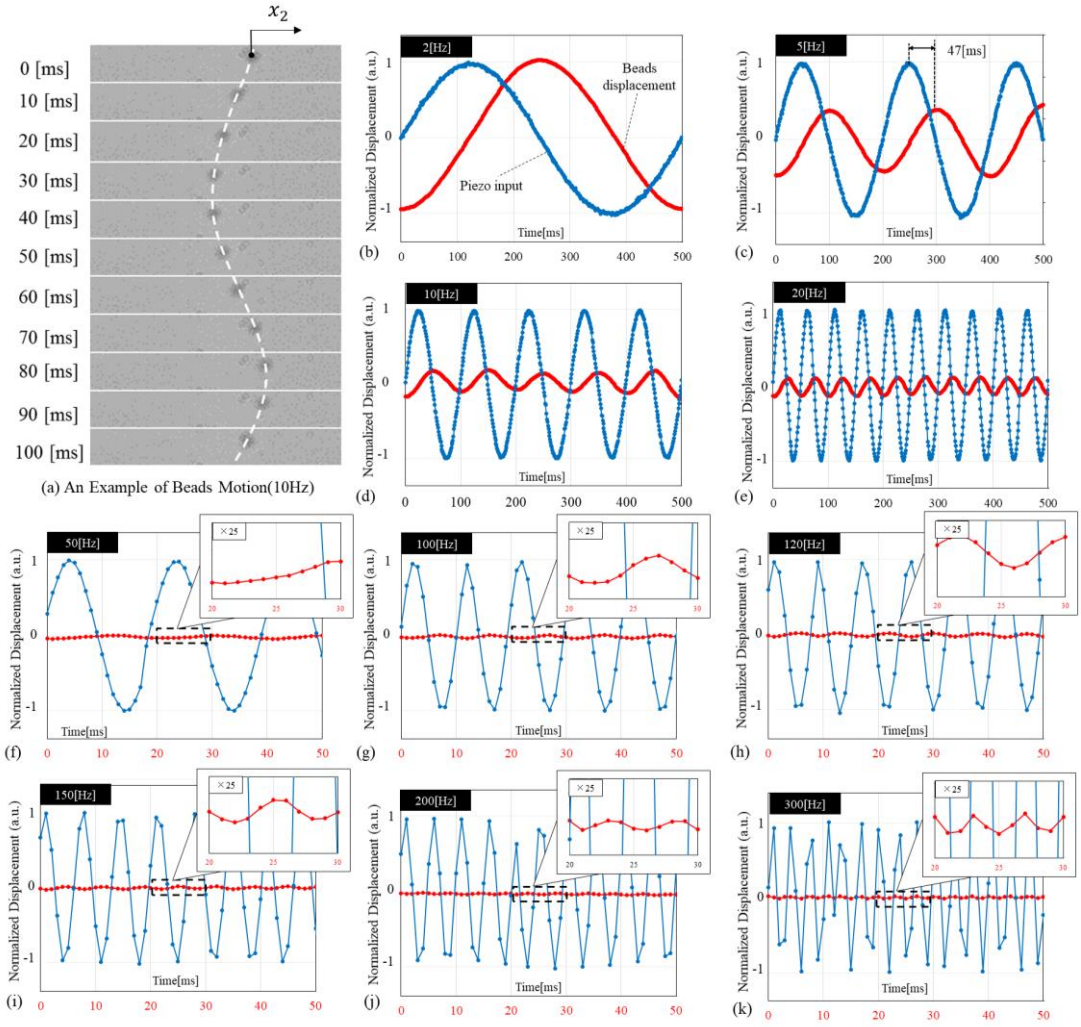


Figure 3.5. The experimental results. (a) A combination of multiple snapshots showing a microbead moving in a sinusoidal function at 10 Hz. (b)-(k) Examples of input-output relations at the frequencies of 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz, 100 Hz, 120 Hz, 150 Hz, 200 Hz and 300 Hz, respectively. For the convenience of reading, the time range is 0 ms to 500 ms in (b)-(e) and 0 ms to 50 ms in (f)-(k).

3.4 予備実験

Fig 3.5 は実験結果の一例である．Fig 3.5 (a)は PZT が 10Hz で動作しているときのビーズの動きを示したものである． Figs. 3.5 (b)-(k)はそれぞれ 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz, 100 Hz, 120 Hz, 150 Hz, 200 Hz 及び 300 Hz の場合の最大振幅で規格化した細胞の動きを示している．Figs. 3.5(b)-(k)のグラフには，各周波数における PZT 及びマイクロビーズの位置，すなわち入力と出力の両方がプロットされている．なお，装置の設置状態により，入力と出力は約 30 倍違っているため，20Hz の入力・出力信号についてはそれぞれ別々に規格化されていることを付記しておきたい．また縦軸は，-1 から 1 になるように調整されている．Figs. 3.5(f)-(k) にはさらにマイクロビーズの微小運動を表示するため，一部拡大表示が行われている．これにより，Figs. 3.5(b)-(k)のように入力信号と出力信号の間に明確な位相差を確認することができる．例えば，Fig 3.5(c)の場合，入出力信号間に 47 ms の遅れを確認することができる．一般的な周波数特性解析に対しては，FFT（Fast Fourier Transform）を適用している．

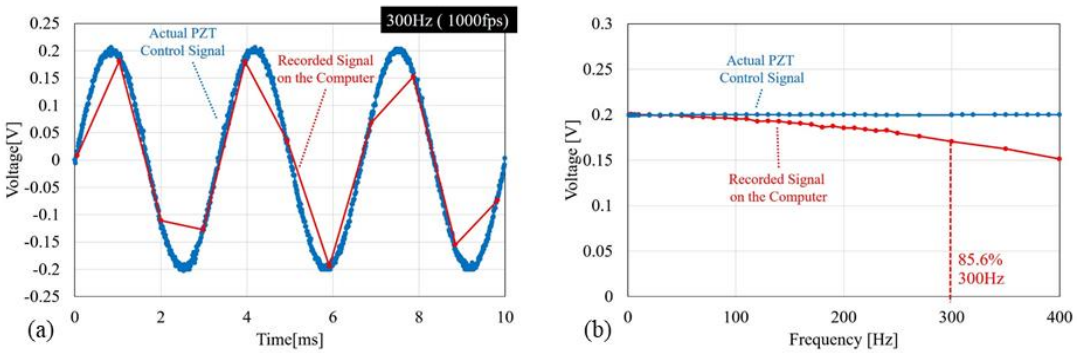


Figure 3.6. The signal distortion due to the limit of temporal resolution in C program. (a) An example of distorted signal at 300 Hz where the input signal is generated at the rate of 100k Hz while the sampling rate on the computer is only 1k Hz. (b) The comparison of the sinusoidal amplitudes on the PZT actuator and on the computer. The computer side remains only 85.6% at 300 Hz.

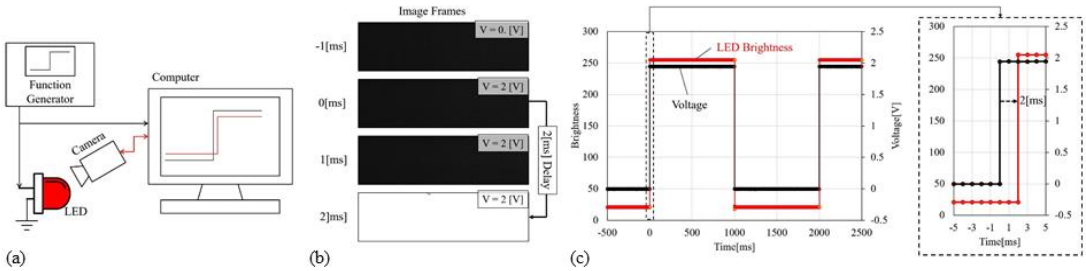


Figure 3.7. The measurement of time delay on the computer. (a) The diagram of the setting. (b) The signal sent to the LED at 0 ms while the high-speed camera captured the LED response at 2 ms. (c) The plot of the input and output in time delay test. The delay is 2 ms.

Fig 3.6 は PZT に与えられた実際の制御信号と A/D 変換器を通して PC 内に記録された信号を表示している．この図より，PC の記録レートの低さにより，高周波数領域において記録信号が元々の正弦波から大きくずれていることが確認できる．このような入力信号のゆがみや計測器系に内在する時間遅れは，正確な伝達特性を得る観点から大きな障害になる．このような問題に対処するため，ここでは，波形発生器及び PC のサンプリング周波数はそれぞれ 100kHz，1kHz に設定している．そのため，少なくとも，PZT への正確な正弦波信号入力は保証されている．したがって Fig 3.6 の PC 記録信号がずれているのは C timer function “timeSetEvent”の処理時間が追いついていないことによるものである．Fig 3.6(b)からもわかるように 100Hz 以下ではそれほど顕著な傾向はでないものの，例えば 300 Hz では顕著になり．A/D 変換器を通して PC で取得された信号をもとに振幅をもとめると，真値の 85%に落ちてしまい，正しいゲイン特性の取得に支障をきたす．それでも高速カメラと波形発生器の同期をとるという意味において，PC への波形入力も必要であることを注意しておきたい．本研究では，機器間の同期をとることの重要性を踏まえた上で，高周波数領域でのゲイン特性に多少の支障が出ることを看過していることを付記しておきたい．

Fig 3.7 は A/D 変換器を通じて取得した信号と高速カメラで記録された信号間にどの程度の遅れが生じているかについて調べたものである．Fig 3.7(a)は実験装置の概要を示した図である．波形発生器出力を直接 LED 発光回路に接続した状態で LED の発光の様子を高速カメラで観察し，両者の間にどの程度の遅れが存在しているのか確認する．Fig 3.7(b)は発光指令信号を出してからどのくらいの時間で高速カメラが LED の光を感知したかを示した図である．この例では，発光指令を PC が出してから，2ms 後に高速カメラが光を検知していることがわかる．Fig 3.7(c)は，実験結果を時間に対してプロ

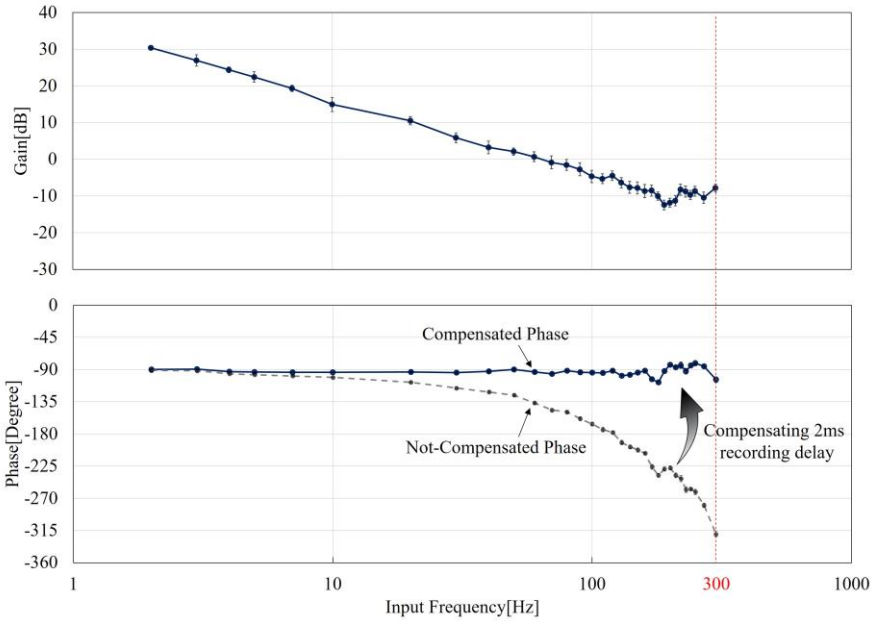


Figure 3.8. The bode plots from experimental results. The upper and lower plots are the gain and phase response, respectively. The delay of 2 ms in the recording system is essential for the phase. Both before and after the compensation plots are shown.

ットしたものである．これらの結果より，波形発生器と高速カメラの同期のずれは 1ms と 2ms の間にある，つまり最大で 2ms とみなすことができる．2 ms の遅れは 10Hz ではわずか 7.2°分の遅れに過ぎないが，100Hz では 72°分，300 Hz では実に 216°の遅れ分に相当し，100Hz 以上の高周波数域ではきわめて大きな位相遅れを作り出すことに留意されたい．

3.5　ゲイン特性と位相特性の実験結果

Fig 3.8 は開ループシステムのボード線図を示している．ここで Fig 3.8 の上下の図はそれぞれ周波数に対するゲイン特性及び位相特性を示している．なお位相については，入出力波形から算出されている．Fig 3.8 からゲインは周波数の増加とともに減少し，200 Hz を超えたあたりで変動しはじめていることがわかる．この変動は，Fig 3.6 に示されているように，波形発生器からの信号を 1kHz サンプリング周波数で PC 内に取り込んでいることに起因しているものと思われる．ここで Fig 3.8 の位相線図には 2ms の機器間の遅れを補償したものと補償していないものが表示されている．2ms の遅れを考慮しない場合，100Hz ですでに 180°近く遅れが生じているのに対し，2ms の遅れを

補償した場合，300Hz 近くまで，90°の遅れをキープしている．このように 2ms の遅れを補償した伝達関数は，典型的な積分形 1/s になっている点に注意されたい．積分形の特徴は，ゲイン特性は周波数に対して-20 dB で減少しつつ，位相は-90°を維持する．単純なシステムモデルから導出した伝達関数（式(3.4)）は二次系をしているものの，実験的に得られた伝達関数はきわめて単純な一次系になっている点が興味深い．

3.6 考察

ここでは，理想的な条件下でアクチュエータ変位とマイクロ流路内の細胞位置の間でどんな入出力関係が成り立つのか考察してみよう．ただし PZT アクチュエータ内には位置センサが内蔵されていて，PZT アクチュエータ出力は理想的な位置制御ができているものとする．ここで $t = 0$で PZT アクチュエータにステップ入力がΔx_1与えられた場合を考えてみよう．Fig.3.3 のモデルの場合，マイクロチップの硬さに関係なく，Δx_1に対応する細胞変位Δx_2は時間無限大では$\Delta x_c = 0$ になるため，連続の式(3.1)より必ず$\Delta x_2 = \Delta x_1 A_1/A_2$に到達する．例えば，マイクロチップの弾性が無限大の場合，無限小の時間$t = \Delta t$でこの位置に到達し，マイクロチップが柔らかさを有している場合でも，$t = \infty$で必ずΔx_2に到達する．一方，マイクロ流路内の流れが層流である限り，圧力差と流路内速度が比例するいう Hagen-Poiseuille の関係に支配される．

$$x_2 = \int \frac{\Delta P}{\kappa} dt \tag{3.5}$$

ここでΔP及び κ はそれぞれマイクロ流路内の圧力上昇，粘性に起因する抵抗係数である．式(3.5)は PZT アクチュエータのステップ入力により発生した圧力に比例する速度で移動する細胞が，時間とともにどのように動くかを示している．重要なことは，粘性 κ が同じであれば，有限な時間内での細胞移動量は圧力上昇ΔPだけで決まる点である．例えば，PZT アクチュエータに同一ステップ入力ステップ入力Δx_1を硬いマイクロチップと柔らかいマイクロチップに与えた場合，硬いマイクロチップの方が内部圧力は上昇し，結果的に早く目標位置に到達できる．次に PZT アクチュエータ位置入力に正弦波を与える場合を考えてみよう．

・低周波数の場合：式(3.5)が積分形であることを考えると，低周波数の場合，一周期分の積分時間が長くなるため出力側の細胞の振幅は大きくなりやすい．

・高周波数の場合：式(3.5)が積分形であることを考えると，高周波数の場合，一周期分の積分時間が短くなるため出力側の細胞の振幅は小さくなりやすい．

PZT アクチュエータの位置とマイクロ流路内細胞位置に対する入出力伝達関数が積分特性を示す理由がここにある．別の言い方をすると，周波数を上げた場合，ゲイン特性は 20dB で低下する．ここで重要な点は力入力ではなく，位置入力になっている点に注意されたい．また，周波数を限りなく小さくしていった場合，ゲインは $\Delta x_2/\Delta x_1 = A_1/A_2$ で頭打ちとなる点にも留意されたい．

3.7 あとがき

本章では，PDMS マイクロ流路内のマイクロビーズを PZT アクチュエータによって操ることを想定し，PZT アクチュエータ先端位置を入力とし，マイクロビーズの位置を出力とした開ループ伝達関数を求めることを目的とし，実験的研究を遂行した．その結果，マイクロ流路内のマイクロビーズの挙動は，300Hz オーダまで圧力差と速度が比例するという簡単な伝達関数が使えることを実験的に示した．さらに PDMS の可動部質量を加味したモデルをたてても，実質的には，300Hz オーダまで質量の影響は大きくないことを示唆している．

本研究では，実験装置の関係で周波数帯域は 300Hz オーダまでに限定したが，3kHz まで上げた場合に，開ループ伝達特性がどのように変化していくのか，さらに PDMS の硬さを大きくした場合に，開ループ伝達特性がどのような変化を見せるのか，興味深いところである．

4　マイクロ流路高周波数伝達特性計測に向けて

4.1　はじめに

4 章では Fig. 4.1(a) のように，赤血球を次元を無視した単純バネモデルに置き換えて評価しようとしている点に留意されたい.

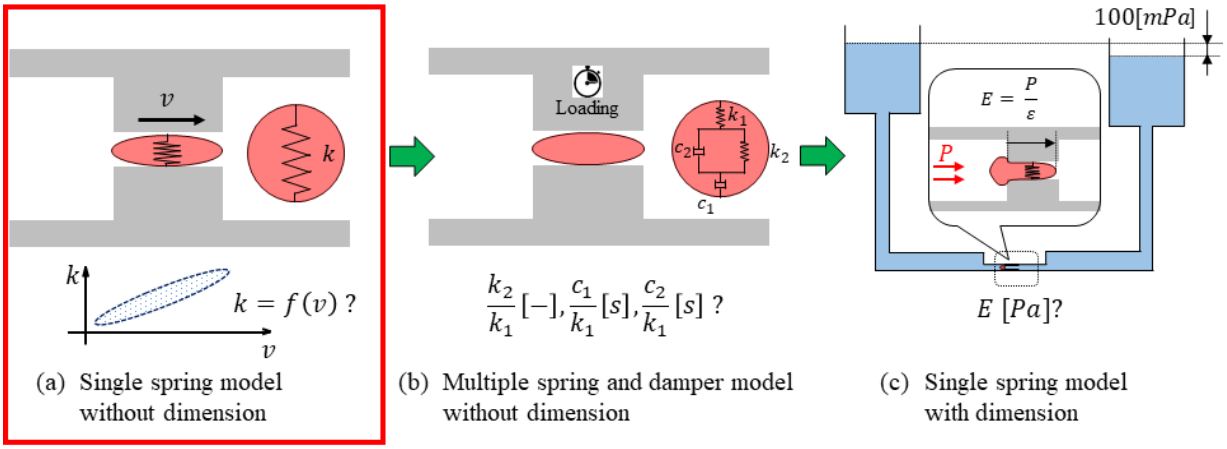


Figure 4.1. The evaluation on mechanical impedance of RBC. This chapter focuses on single spring model without dimension as shown in (a).

これまで PDMS マイクロ流路を用いた細胞マニピュレーションの伝達関数の研究では印加周波数は高々130Hz 程度に制限されていた．その一番の理由は，PZT アクチュエータへの入力正弦波信号印加時間と高速ビジョンの動作開始時間との間に 2msec の遅れ時間が存在しており，これが高周波数領域での見かけ上の位相遅れを作ってしまうことにあった．ただし，位相特性を無視し，ゲイン特性だけに着目するのであれば，アクチュエータドライバに入力される正弦波形が関数発生器により正確に入力される限り，システムの入出力伝達特性は測れるはずである．　本章ではこのような視点に立って，数 kHz の高周波数領域で PDMS マイクロ流体チップがどのような動特性を示すか実験的に考察してみたい.

4.2　実験装置

Figs. 4.2(a), (b)はそれぞれ実験装置のイラスト及び写真である．実験装置は大きく信号入力部とビジョン出力部により構成されている．信号入力部は関数発生器（Function

Generator：WF1944B Wave Factory Ltd.），アクチュエータ，及びシリンジポンプにより構成されている．またビジョン出力部は，PDMS マイクロ流体チップ，顕微鏡（IX71, Olympus Ltd.），高速カメラ（IDP, Photron Co. Ltd.），及び PC により構成されている．また可視化するために直径 1μm のマイクロビーズ（4009A Thermo Fisher Scientific Inc.）が使われている．高速カメラのデータ取得最高周波数 10,000frames/sec に設定されている．このシステム構成は基本的には 3 章のシステム構成と同じであることを付記しておきたい．

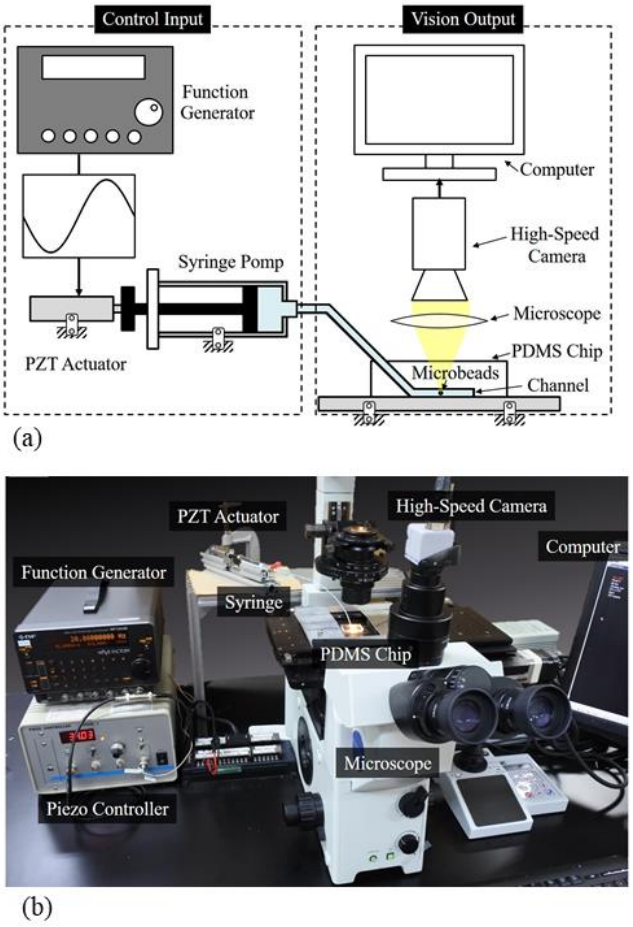


Figure 4.2. The experimental setup. (a) A diagram illustrates the construction of the system. (b) A photo of the system [14], [21], [42].

4.3 実験結果

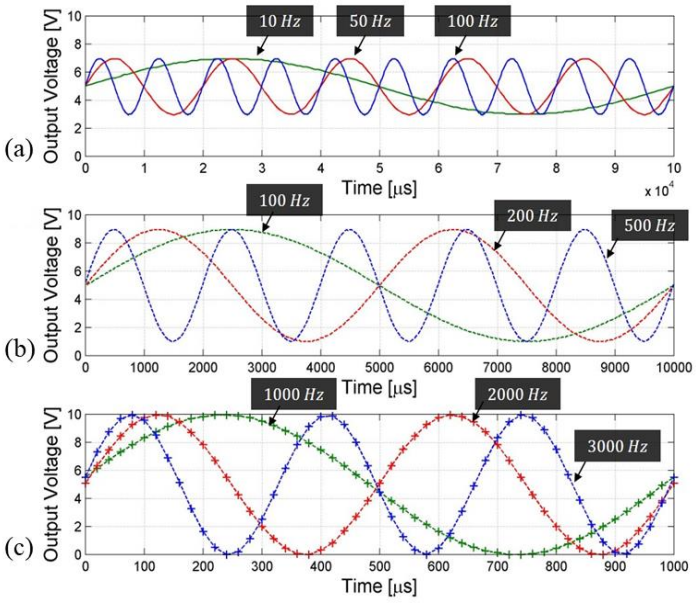


Figure 4.3. Examples of measured input signals for PZT actuators. Three different amplitudes of sinusoidal were employed to incorporate with gain changes in a wide span of frequencies. The peak-to-peak amplitude and frequency range are (a) 4 V for the frequencies below 100 Hz. (b) 8 V for the frequencies between 100 Hz and 500 Hz. (c) 10 V for the frequencies over 1000 Hz.

Fig. 4.3 は関数発生器から PZT アクチュエータに入力される信号を 3 つの異なる振幅に対して測定した例である．ここで Fig. 4.3 (a)は関数発生器からの出力 4V に設定した状態で，周波数を 10Hz, 50Hz, 100Hz と変化させた場合，Fig. 4.3 (b)は関数発生器からの出力 8V に設定した状態で，入力周波数を 100Hz, 200Hz, 500Hz と変化させた場合，Fig. 4.3 (c)は関数発生器からの出力 10V に設定した状態で，入力周波数を 1000Hz, 2000Hz, 3000Hz と変化させた場合の測定例である．Fig. 4.3 より，関数発生器から指令値通りの信号が出力されていることを確認することができる．

Fig. 4.4 は，PZT 入力電圧振幅 10V の正弦波を入力した場合のマイクロビーズの時間的位置変化を示すスナップ写真である，ここで Fig. 4.4 (a), (b)はそれぞれ 100Hz および 1000Hz の場合の結果である．この場合，マイクロビーズの振幅は，100Hz および 1000Hz に対して，それぞれ 90μm,および 2μm である．Fig. 4.4 より，マイクロビーズの振幅は周波数の増加に応じて激減している様子がわかる．さらに，Fig. 4.4(b)より，周波数に依存したドリフト運動もマイクロビーズの運動に重畳していることもわかる．

Fig. 4.5 は，マイクロビーズの運動をイメージプロセッシング処理によってオフラインで追跡処理した結果である．なお縦軸はピクセルで表示している．キャリブレーションにより 1 ピクセルは 240nm に相当していることを確認している．Fig. 4.5 からもドリフトが周波数の増加とともに大きくなっていることがわかる．さらに 3000Hz の場合，顕著なジグザグ運動も見てとれる．

Fig. 4.6 はこれらの結果をもとに算出したゲインの周波数特性を示したものである．周波数帯域によって印加電圧の振幅を変えているにも関わらず，ほぼ一様なゲイン特性が得られている点を強調しておきたい．ここで赤色の曲線は 3 章の式(3.4)を用いて最小二乗法でフィッティングした線である．さらに 3 章と同じ式を用いているにも関わらず，3000Hz 付近まで実験結果とフィッティングした線は比較的よく一致している点も留意されたい．

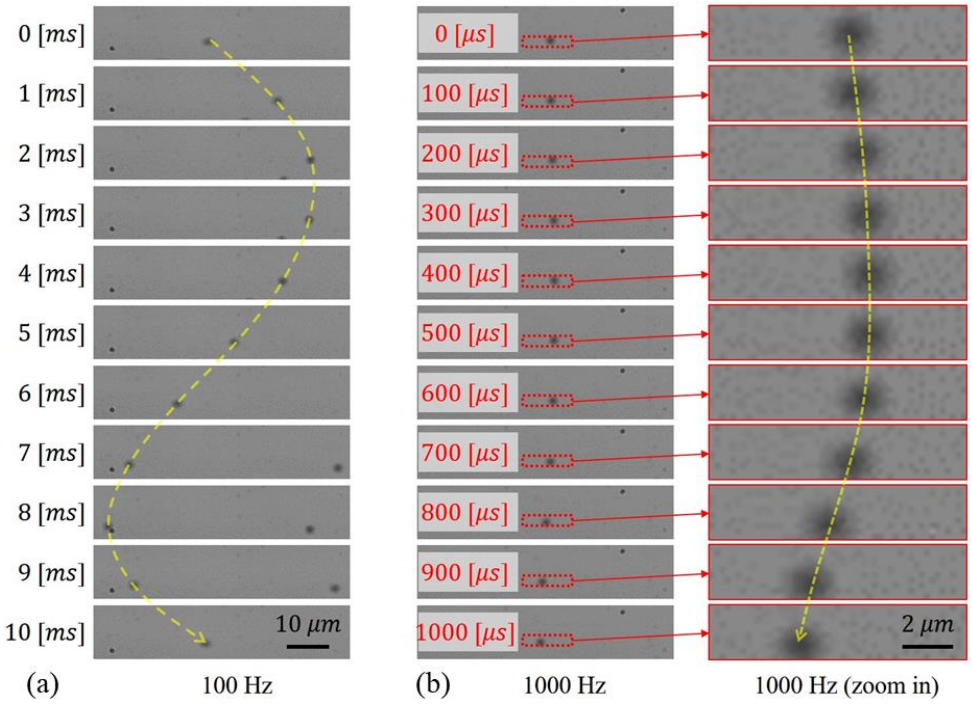


Figure 4.4. Snapshots of microbeads motion inside the channel. (a) Sinusoidal input with 10 V peak-to-peak voltage at 100 Hz. (b) Sinusoidal input with10 V peak-to-peak voltage at 1000 Hz.

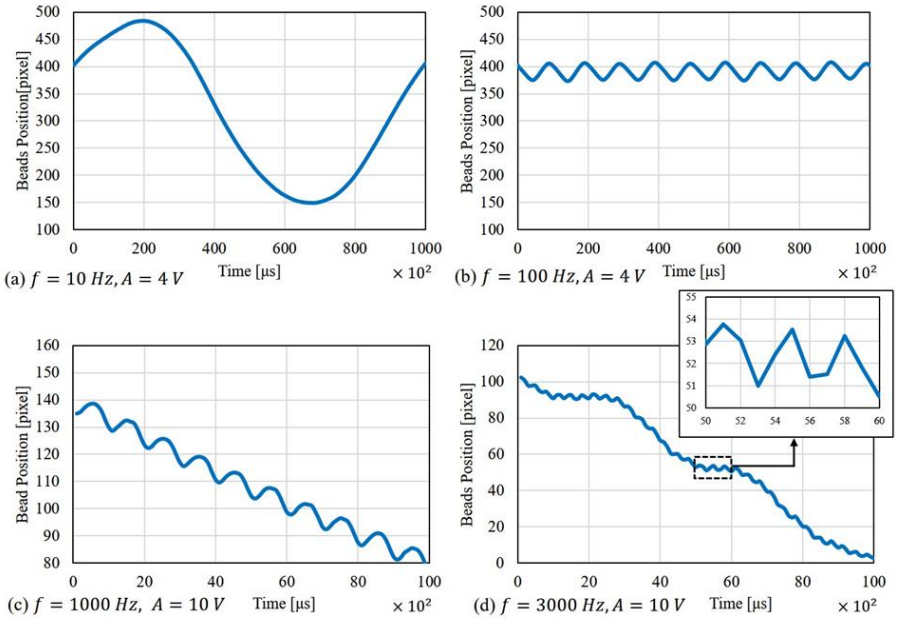


Figure 4.5. The motion of microbeads tracked by image-processing. One pixel distance is equivalent to 240*nm* in real world. The plots are the trajectories of single microbeads with the input parameters in Fig. 4.3 of (a) f =10Hz,V =4V (b) f = 100Hz,V = 4V, (c) f = 1000Hz,V = 10V, and (d) f = 3000Hz,V = 10V.

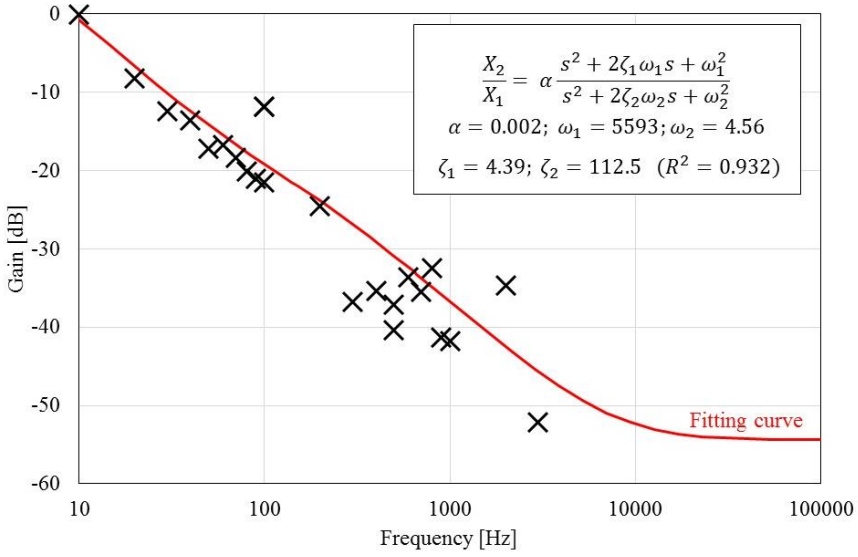


Figure 4.6. The gain characteristics of the manipulation under different input frequencies [42].

4.4 あとがき

本章では，マイクロ流体チップ内のマイクロビーズをマニピュレーションする場合，PZT アクチュエータへの印加周波数を 3000Hz まで上げた場合にどのような特性が見えるのかについて，マイクロビーズの動きをマーカーとして用い，その動きを高速ビジョンで捉えることによって，入出力関係を求め FFT を駆使して，ゲインの周波数特性を調べた．2000Hz, 3000Hz あたりでは振幅が数 μm と小さくなり，ゲイン特性にばらつきが見られたものの，全体的にはマイクロ流路出入り口間の圧力差がマイクロ流路内平均速度に比例する Hagen-Poiseuille 流に準じて，マイクロビーズの振幅が周波数に対して-20dB/dec で減少するという基本特性が追認された．

5　干渉型ハイブリッドアクチュエーション

5.1　はじめに

本章では Fig. 5.1(b) のように，赤血球を次元を無視した複数バネ，複数ダンパーモデルに置き換えて評価しようとしている点に留意されたい．

赤血球の硬さ評価[1], [2], [13], [17]，変形能評価[25], [29], [48]，ローディング [15], [27]，赤血球ストレス試験[32], [33]といった赤血球特性試験では，マイクロ流路内で単一赤血球の高速・高精度のマニピュレーション技術が要求されている．基本的にマイクロ流路両端に圧力差を加えれば，それに応じてマイクロ流路内の赤血球は移動する．この場合，単純に一定の圧力差を与えるのでなく，メカトロニクス技術を駆使し，赤血球を戦略的に操って，いままでにない赤血球特性をみようという試みが行われるようになった．いわゆるアクティブ細胞マニピュレーションである[8]．例えば，赤血球の位置を実時間高速ビジョンで計測しつつ，アクチュエータにフィードバックすることで，マイクロ流路内の狭窄部内を一回だけ通過させ，狭窄部内の赤血球の長さ，狭窄部外の赤血球の形状変化を観察して，赤血球の変形能を評価する方法がこれに対応する．その際，高速かつ精密な位置決めが可能であるという利点から PZT がよく使われる．一方で，PZT の一番の欠点はストロークが短いという点で，通常は数 10 μm である．このため，ストロークの限界から，PZT は赤血球のマニピュレーション中，しばしば赤血球の捕獲に失敗してしまう．特に長時間の赤血球ローディングにおいて，

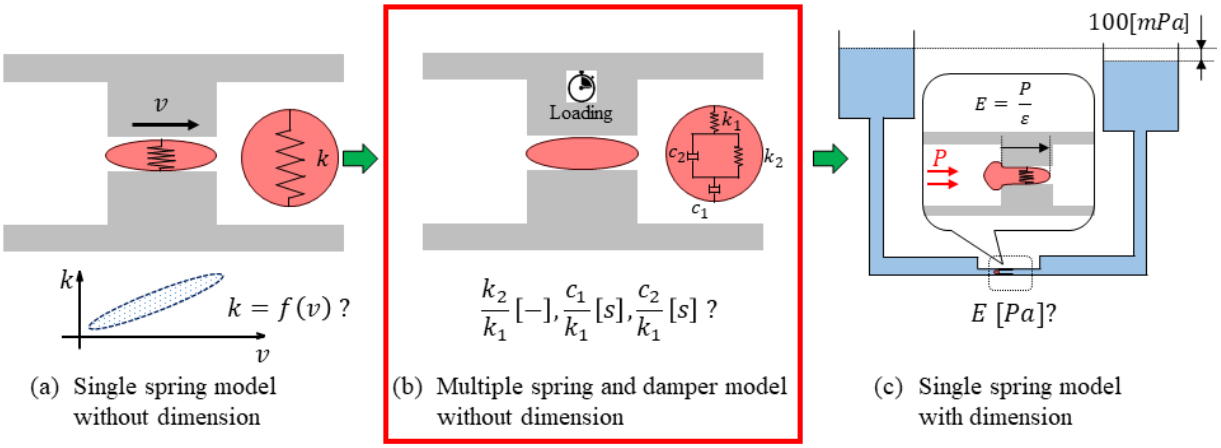


Figure 5.1. The evaluation on mechanical impedance of RBC. This chapter focuses on multiple springs and dampers without dimension as shown in (b).

この問題がしばしば発生し，その対応が求められている．この問題に対処するため，実験中に必要に応じて人海戦術で圧力調整が行われることがあるが，長時間にわたる場合には実験補助員への負担が増大する．

Fig. 5.2 は従来の赤血球マニピュレーションシステムとここで提案するシステムを示している．Fig. 5.2(a)は，マイクロ流路内の赤血球写真の一例である．ここでは赤血球は，マイクロ流路内の流れと同じ速度で移動するものと仮定している．Fig. 5.2(b)は従来システムの一例で，実時間高速ビジョンからのフィードバック信号に基づいて，PZT に接続されたシリンジポンプによって，マニピュレーションが実行されている．Fig. 5.2(c)は本研究で提案される干渉型ハイブリッドシステムである．このシステムは従来システムで使われている PZT に加え，重力補償用スライダが取り付けられている．このスライダは長時間の赤血球ローディングに発生するマイクロ流路内のドリフトに対処するためである．つまり PZT がストローク限界に到達する前に液体容器の位置を上下させ，マイクロ流路出入り口の圧力差に微小圧力オフセットを与えることにより，PZT のストローク限界の到達 を防ぐことが目的である．例えば，ストローク 40 μm の PZT が赤血球マニピュレーション中にすでにストローク 30 μm に到達しているものとしよう．この場合，コントローラはスライダに対し，液体容器を上昇（あるいは下降）させるように指令し，PZT が限界ストロークに到達するのを防止する．スライダ動作

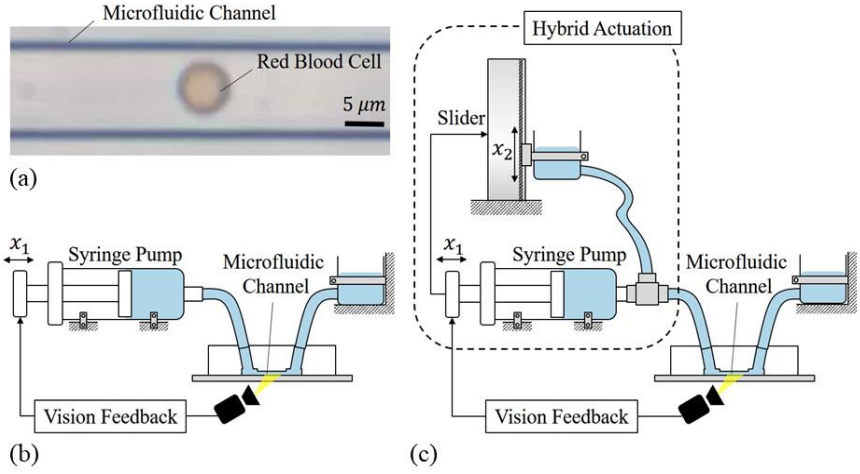


Figure 5.2. An overview of the proposed actuation system. (a) The system is targeted on manipulating a cell inside a microfluidic channel. (b) Conventional cell manipulation is performed with a single PZT-actuated syringe pump. (c) The proposed hybrid actuation system includes both a PZT-actuated syringe and a gravity-based slider for long-term manipulation [23], [19].

に伴う圧力変化はきわめて微小で．赤血球の変形にほとんど影響することなく，PZT のストロークを下げるのに効果があるだけである．

本章では，従来システムと提案システムに対して比較実験を行う．ただし操作対象としては赤血球を用い，実時間高速ビジョンを用いてマイクロ流路内の赤血球の動きを追跡する．赤血球ローディング実験を行った結果，従来システムの場合，10 分以内で PZT がストローク限界に到達し，赤血球保持ができなくなったのに対し，干渉型ハイブリッドシステムを用いた場合，連続的に 30 分以上，赤血球を保持し続けることができた．さらにマイクロ流路内赤血球の応答特性と管路の機械インピーダンスの関係についても考察し，管路径の設計が応答特性を決める上で重要であることを示唆している．

5.2 従来研究

マイクロ流路内赤血球マニピュレーションでは，一般に PZT あるいはリニアスライダが使われ，これまでに赤血球の変形能計測という観点から多くの研究が行われてきている[2], [6], [12], [25], [31], [32]．このうち PZT はマイクロ秒オーダの応答特性を有しており，マイクロ流路内赤血球の高速マニピュレーションに貢献しているものの，PZT の最大の欠点はストロークが 40μm と短い．一方で，重力補償方式に準拠した赤血球マニピュレーションは，圧力センサフィードバックを行わなくても開ループで赤血球の高分解能制御が実現できるという利点を有しており，これまでにも多くの研究成果が報告されている[16], [20], [26], [40], [41], [44], [45], [47]．例えば，重力補償方式に基づくアクチュエータ方式では，赤血球 1 個分（100mPa）という驚異的な分解能を実現されている．ただし，重力補償方式は印加圧力が水柱の高さによって制限されるため，高速性に欠けるという問題点を有している．例えば，水柱 300 mm で生成できるマイクロ流路出入り口間の圧力差はわずかに 3 kPa に過ぎない．このように，単一アクチュエータの研究は多いものの，アクチュエータの長所を積極的に利用したハイブリッドアクチュエーションに関する研究はほとんど行われてない．

5.3 新しいアクチュエーションシステムへのニーズ

Fig. 5.3 は，単一の PZT アクチュエータだけで，赤血球の位置保持実験を行った場合の結果を示している．Fig. 5.3(a)は位置目標値 17μm で位置フィードバック制御を行っている．ここで実際の細胞位置は赤線で示されているように，実験開始からほぼ 500

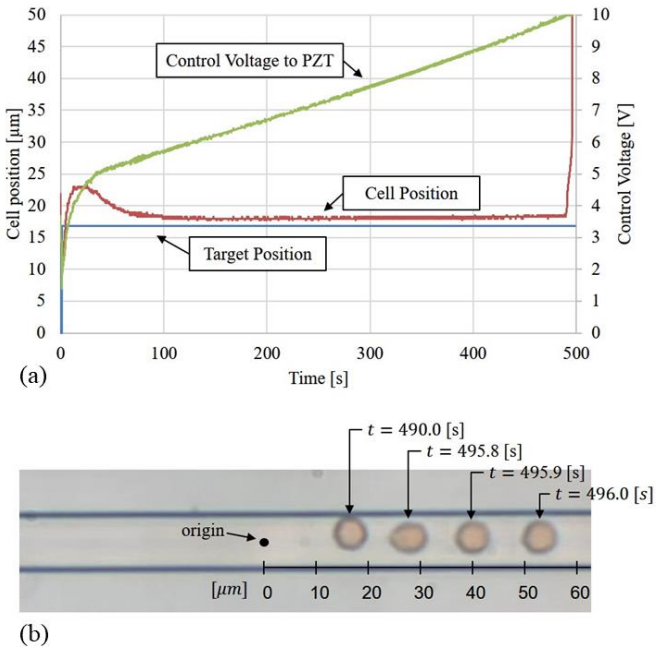


Figure 5.3. The limitation of single PZT actuation system. (a) In short time period, a cell can be effectively manipulated due to fast response of PZT actuator. (b) In long time period, PZT went beyond the manipulation region due to limited stroke length.

秒経過時点で位置保持ができなくなり，目標位置から大きくはずれている．Fig. 5.3(a) 緑線は PZT へ与えられる制御電圧を示している．ただし，電圧値に関しては右軸の数値が対応している．Fig. 5.3(a)から，実験中，PZT への印加電圧は徐々に上昇し，10V に達したところで赤血球の保持に失敗していることがわかる．物理的には，予期しない圧力リークがマイクロ流路内で発生し，それに対応するため PZT のストロークが徐々に伸びて行き，やがてストローク限界に到達した時点で，赤血球維持ができなくなったと考えられる．ちなみに PZT への電圧指令値は 0〜10V の範囲であり，これを超えた入力指令を与えても，実際には下限，上限でホールドされてしまう．Fig. 5. 3(b) は，PZT がストローク限界に近づいた際に，赤血球の位置保持ができなくなり，赤血球が徐々に右側に移動している様子を示した写真である．圧力リークやドリフト流等は通常のマイクロ流路内では一般的に存在し，これらを完全に排除したシステム構築はきわめてむつかしい．このようなマイクロ流路固有の問題が介在する中で，短ストロークの PZT だけで長時間の赤血球を所定の位置に保持し続けることはむつかしく，ここに新たなアクチュエーションシステムに対する強いニーズがある．

5.4　干渉型ハイブリッドアクチュエーション

Fig. 5.2(c)は，ここで提案するハイブリッドアクチュエーションシステムの概念図である．このシステムは PZT と重力補償型アクチュエータの組み合わせにより構成され，ターゲット細胞はマイクロ流路内で操作される．重力補償型システムは液体容器の一方をスライダによって駆動される形になっている．なお，液体容器はそれぞれチューブを介してマイクロ流路出入り口に接続されている．また液体容器の上面は大気に開放されている．また PZT はシリンジ，三方管を介してマイクロ流路入口部のチューブに接続されている．Fig. 5.2(c)からわかるように，PZT と重力補償型アクチュエータは三方管を介して接続されているため，PZT とスライダの出力が互いに干渉し合う．例えば，PZT だけ駆動した場合，シリンジポンプから排出された流体は，マイクロ流路だけでなく，一部の流体は液体容器の液面を増加させる．つまり，マイクロ流路内の赤血球の動きは，それぞれのアクチュエータの出力が単純に足し算的に現れるのではなく，二つのアクチュエータの出力が干渉し合った結果として現れる．これは，本システムの設計上のむつかしさであるとともに，研究としての面白さでもある．

Fig. 5.4 は干渉型ハイブリッドアクチュエーションが動作している時の赤血球位置の目標位置，赤血球の実際の位置，及び PZT の入力電圧を示した図である．Fig. 5.4(a)は，ストロークが小さい PZT だけで赤血球保持がむつかしい場合，直面する問題について説明した図である．圧力リーク等に対応するため，PZT 入力電圧指令値が増加し，やがて PZT のストローク限界に到達した時点で，赤血球保持ができなくなってしまうという状況設定を理解した上で，干渉型ハイブリッドアクチュエーションの制御方法について説明してみたい．ここでは，Fig. 5.4(b)で示されるように，PZT 入力電圧に仮想上限値 (Upper Threshold) と仮想下限値 (Lower Threshold) を設定する．ただし，それらは余裕を見込んで，仮想上限値は実際の上限値（10V）より小さく，また仮想下限値は実際の下限値（0V）より大きく設定しておく．マイクロ流路内の赤血球マニピュレーションは基本的にはビジョンによって赤血球の位置を実時間高速ビジョンで捉え，PZT にフィードバックすることで実行される．これに対して，スライダは，PZT 指令値が仮想上限値，仮想下限値に達したときだけ微小量動作させ，PZT が絶えずストローク内に入るように制御される．この制御によって，PZT のストロークが絶えず動作範囲内に入るように制御されている．Fig. 5.4(b)の PZT 入力電圧の破線はこのリセット動作に対応している．スライダは一般に数十センチオーダのストロークを有するため，

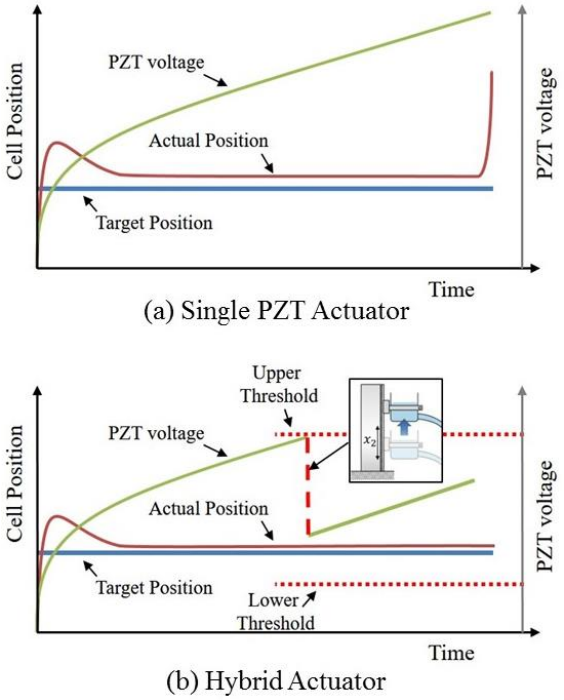


Figure 5.4. The control scheme and the comparison with conventional method. (a) In conventional single actuator method, the PZT voltage may saturate after certain amount of time maintaining cell position. (b) In the propose hybrid system, the gravity-based pump balances pressure when PZT voltage hits the thresholds.

スライダがストローク限界に到達することは一般には考えられない．このようにスライダの動作は見かけ上 PZT のストロークを長くする役目を演じている．結果的に，赤血球保持時間を大幅にのばすことができる．

一方，両アクチュエータは三方管を介して互いに干渉しあっていることに注意されたい．PZT が動作するとき，流体は赤血球マイクロ流路側と三方管側の液体容器の両方に流れる．マイクロ流路側の流れが結果的に赤血球を直接操作する一次的な駆動流を引き起こす．一方で液体容器側に入った流体は一度液面を押し上げ，押し上げられた水柱が，マイクロ流路内流体の二次的な駆動流を作り出す．二次的な流れは水柱上昇が作り出すもので，その時定数は PZT の動作が直接作り出す一次的な駆動時定数に比べて十分大きい．これがアクチュエータ間干渉の開ループ系での基本メカニズムである．一方，実時間高速ビジョンを用いた閉ループ制御を行うと，PZT によって作り出される一次的な駆動時定数が二次的な流れによる駆動時定数に対して圧倒的に小さ

いため，二次的な流れによる赤血球への影響はすばやく補償される．そのため，赤血球マニピュレーションという切り口で考えた場合，PZT は赤血球の高速マニピュレーション，スライダはあくまでも PZT の見かけ上のストローク長の増大と，両アクチュエータの役割を明確に分けることができる．なお干渉効果については，抵抗 R とコンデンサ C を使った電気回路モデルを使って表現することもできる．この点については後の考察において詳述する．

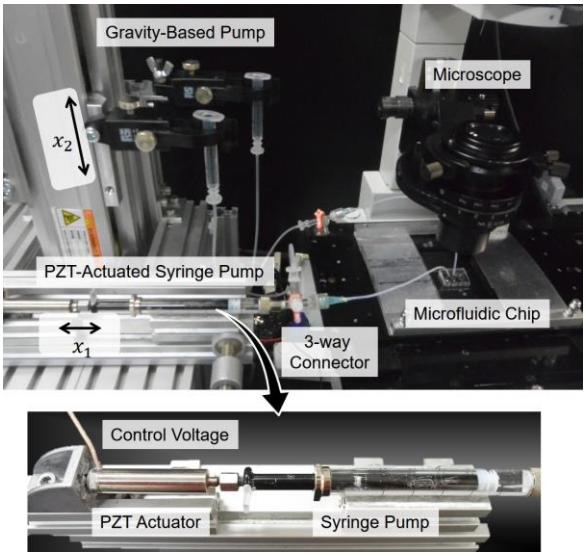


Figure 5.5. A photo of the experimental system. A PZT actuator and a linear slider are connected by a 3-way connector for the proposed hybrid system.

5.5 実験装置

Fig. 5.5 は実験システムの外観である．Fig. 5.5 の下部の写真は，PZT とシリンジを接続したアクチュエータの詳細がわかる拡大写真である．このシステムは，マイクロ流路内の流体を高速制御するための PZT (PSt150/5/40, Messtech Co.)，PZT のストローク長を補うためのスライダ(RSH205, Misumi Co.)，マイクロ流路を内蔵したマイクロ流体チップ，赤血球の大きさを拡大するための顕微鏡(IX71, Olympus Co.)，赤血球位置を追跡するための実時間高速ビジョン(IDP, Photron, Co.)，制御系を管理する PC により構成されている．スライダには上面が大気に開放された液体容器が取り付けれている．この液体容器からシリコンチューブを介して，マイクロ流路入り口部に接続されている．

PZT アクチュエータは，三方管を介して，シリコンチューブに接続されている．なお，PZT はそのストロークに応じて流路内の圧力変化を生成している．ただし，ここでは，圧力センサを組み込んで圧力フィードバックを行うのではなく，あくまでも実時間高速ビジョンにより必要に応じて 1000frames/sec で位置フィードバック制御が行えるようになっている．なお，Fig. 5.5 のx_1 及び x_2は，それぞれ PZT 及びスライダの動作方向を示している．これらのストロークはそれぞれ 40 μm および 300 mm である．またマイクロ流体チップは PDMS 製で内部にマイクロ流路が組み込まれている．

Fig. 5.6 は，マイクロ流路上面図と正面図である．マイクロ流路は，高さ 3.5 μm で単層構成になっている．シリコンチューブに繋がれている流路幅及び細胞マニピュレーション用流路幅は，それぞれ 200 μm 及び 10 μm に設計されている．言い換えると，試験される細胞は高さ 3.5 μm，幅 10 μm のマイクロ流路内で操作される．一般に赤血球は，直径 8 μm 以下，厚さ 2 μm 以下の両面が凹んだ円盤形状をしているため，マイクロ流路内ではマニピュレーション中，壁面に接触することなく，流路内に浮いている状態になっている．

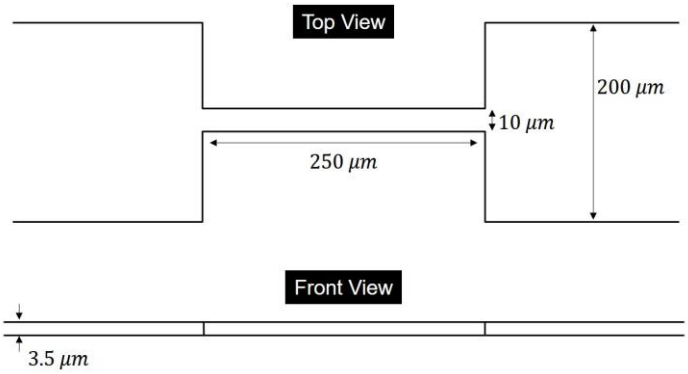


Figure 5.6. The design of the used microfluidic channel. (a) The dimensions of the channel. (b) a photo of the channel during experiments.

マイクロ流路の製造は以下の通りである．はじめにネガティブフォトレジスト SU8-3005 を使った標準的なフォトリソグラフィ過程を経て，シリコンウエファー上にマイクロ流路をパターン化する．PDMS と硬化剤の混合されたものはマスターパターンに対して上部より注がれる．PDMS が注がれた後，Fig. 5.5 の液体容器とマイクロチップを接続するチューブ取り付け口はパンチング機器を使ってチップ上に開けられる．最終的に PDMS チップがガラス基板上にボンディングされ，チップの一連の加工が完了する．

5.6 実験手順

実験で使用された赤血球は実験の主旨に同意したボランティア被験者から取得されたサンプルが利用されている．なお血液サンプルはライセンスを取得した医師により採取され，実験の 15 分前に生理食塩水で 200 倍に薄められて使用されている．生理食塩による希釈作業の目的は，1 マイクロリッターあたり 5 百万個も存在する赤血球を実験しやすいレベルに薄めるためである．この希釈作業を行わないと，マイクロ流路内に絶えず複数の赤血球が存在し，一つの赤血球を狙った形でマニピュレーションを行うことは困難である．生理食塩水で希釈された血液は，マイクロチップにチューブを接続する前にチップ入口穴から注入されるとともに，シリンジにも注入される．その後，液体容器，シリンジ，チップ間をチューブで接続して，実験開始準備が完了する．PZT アクチュエータに対しては PID 制御を適用し，スライダに対しては ON-OFF 制御が適用される．スライダの駆動は圧力漏れやドリフト流によって，PZT の印加電圧が限界に到達したときだけ，補償制御を行うため，ON-OFF 制御で十分対応可能である．実験では，はじめにマイクロ流路内の画像を背景画像として取得し，実験中は絶えず背景画像との差分をとり，赤血球だけを抽出するようにしている．マイクロ流路内の画像は実時間高速カメラで取得し，差分画像を適当な閾値を用いて二値化した後，赤血球先端を位置情報とし，位置フィードバック制御に用いられる．なお実験では赤血球の目標位置は原点から 16.8 μm の位置に設定し，位置フィードバックを行う．

5.7 実験結果

Fig. 5.7 は実験中にビデオ録画されたマイクロ流路内の赤血球の動きを連続写真表示したものである．ここで Figs. 5.7(a), (b)はそれぞれ PZT アクチュエータだけの場合と，ハイブリッドアクチュエータを用いた場合の映像から，2 分毎に 30 分間取り出した写真である．なお各画像に表示されている座標系及び右上の時刻は，画像データ取得後に画像サンプリングレートをもとに割り出した値を付与したものである．なお時刻の単位は min（分）である．Figs. 5.7(a), (b)の最初の画像に示されているように，両実験とも赤血球の初期値$x = 0$ μmの条件のもと，$t = 0.001\ sec$ において目標値入力$x =$ 16.8 [μm]が与えれて，それ以降はその位置がどの程度維持できるかを調べている．また両実験とも PZTアクチュエータに関してx軸方向に対し同じ制御則を適用している．

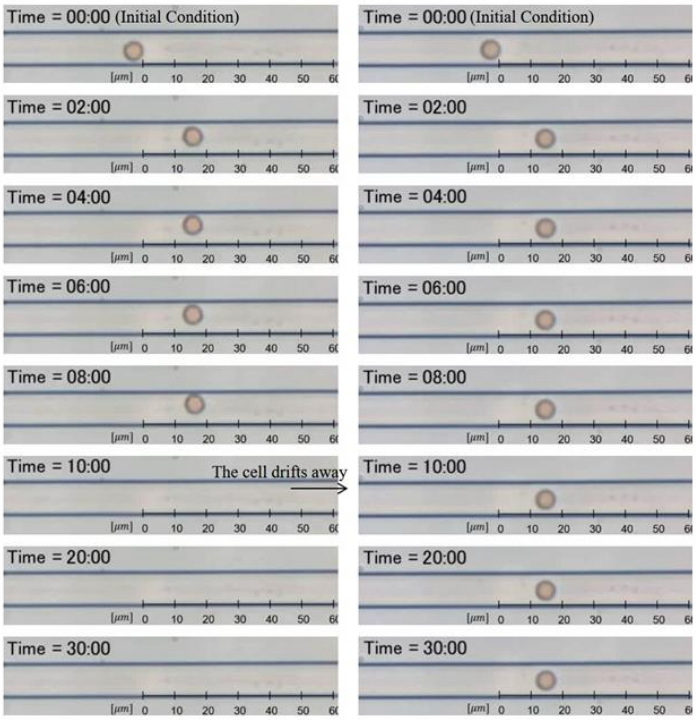


Figure 5.7. The cell images captured from the recorded videos in experimes. (a) Cell position at different times with conventional single PZT actuator. (b) Cell position at different times with the proposed hybrid actuator system.

なお，Figs. 5.7(a)の 4 分以降において赤血球が流路上部に存在しているのは，x軸方向以外の運動については全く制御していないことに起因する．ここで注目すべき点は，実験開始後 496 秒 (8 分 16 秒)経過したときに PZT アクチュエータだけで制御した場合には，赤血球の定点位置制御が維持できなくなり赤血球は右側に逃げてしまう．この様子は Fig. 5.7(a)からもわかる 8 分までは維持できているが，10 分以降赤血球がいなくなっていることからも確認することができる．一方，Fig. 5.7(b)からもわかるようにハイブリッドシステムを用いると，実験開始後 30 分経過しても，赤血球は所定の位置に静止している．ここで注意しておきたいことは，Fig. 5.7(b)の最後の 30 分という表示は，そこに時間限界があるという意味ではない．実際この実験では 34 分まで実験が継続されたが，その間，赤血球位置は維持され続けられていたことを付記しておきたい．Fig. 5.7 の実験結果は PZT アクチュエータだけの場合とハイブリッドアクチュエータの場合の歴然とした違いを示すエビデンスである．

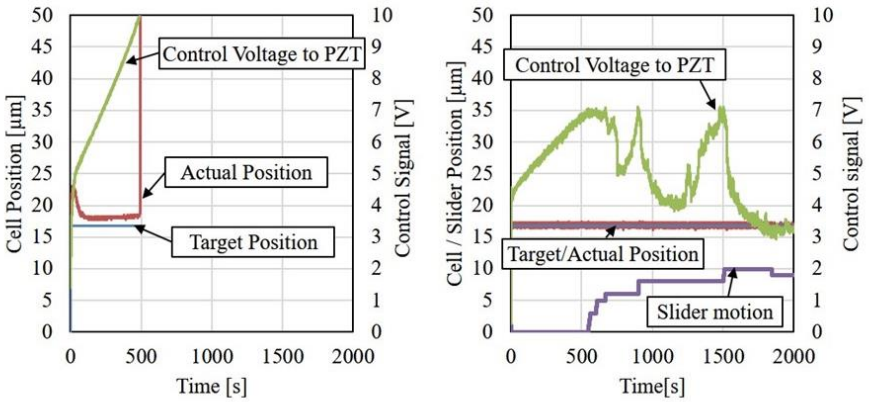


Figure 5.8. The tracked cell positions and given PZT voltage corresponding to Fig. 5.7 (a) and (b).

Fig. 5.8 は，Fig. 5.7 の実験中における細胞位置と PZT 電圧を時間軸に対して示した図である．ここで青色，赤色，緑色の線は，それぞれ細胞の目標位置，実際の細胞位置，そして PZT ドライバに送る印加電圧である．PZT アクチュエータだけでマニピュレーションする場合，実験開始後 488 秒経過したときに赤血球の位置制御は崩壊してしまう．Fig. 5.8(a)の PZT ドライバに送る印加電圧が実験開始後 488 秒において，出力限界 10V に到達していることがわかる．PZT ドライバに送ることができる印加電圧は 0～10V である．つまり，実験開始後 488 秒において細胞の位置制御に失敗する原因は PZT ストローク限界に到達したため，ドリフト流や圧力リーク等に対して PZT アクチュエータがマイクロ流路内の赤血球を Pushing/Pull 操作できなくなったことに起因する．一方，Fig. 5.8(b)はここで提案するハイブリッドシステムの場合の結果を示している．この図からもわかるように赤血球の目標位置と実際の位置の違いが区別できない程度によく一致していることがわかる．ここで PZT アクチュエータの印加電圧は 3V～7V の範囲に絶えず入るようにスライダがドリフト流や圧力リークに対応している．ここでスライダの補償運動は，Fig. 5.8(b)において紫色の線で示されている．なおスライダ位置については右側の座標軸を参照されたい．Fig. 5.8(b)の緑色の線から，印加電圧が，スライダの補償動作によって 3V～7V の範囲に絶えず入っていることを確認することができる．なおスライダの補償動作は，頻繁に行う必要性はなく，PZT アクチュエータのストローク長の余裕に応じて，間欠的に行うだけで十分である．ここでは実質的に上限閾値を 7V，下限閾値を 3V に設定し，この閾値を外れた時点で，サンプリング周期毎に 10 μm の分解能でスライダを上下に駆動するという簡単な制御則を付与している．

5.8 考察

ここで提案しているハイブリッドシステムではそれぞれのアクチュエータがそれぞれ異なったゴールを目指している．例えば，PZT アクチュエータはマイクロ流路内の細胞の位置決めを目的とし，スライダはマイクロ流路内の圧力リークやドリフト流に対する補償を目的としている．原理的にはたとえ圧力リークやドリフト流があったとしても，それらを外乱と捉えれば，PZT アクチュエータだけで，対応できるはずであるが，PZT アクチュエータのストロークが十分とれないため，スライダにプラスアルファのストロークを補てんしてもらっていると考えるのが自然である．

一方，PZT アクチュエータとスライダの各入力はハイブリッドシステムの出力に独立に影響しているわけでなく，干渉し合っている点に留意する必要がある．Fig. 5.9 は，アクチュエータ間の干渉効果を説明したイラスト図である．例えば，スライダの動きがない場合であっても，PZT アクチュエータに入力が与えられると，それによって押し出された流体は細胞駆動の直接的原動力となるマイクロ流路内の流速変化と液体容器の重力バランスを崩すことで間接的に細胞運動に影響を与える液面高さを変える．前者の流速変化は Fig. 5.9 における細胞移動“x_1”を作り出し，後者の液面変化は Fig. 5.9 における細胞移動“x_2”を作り出す．例えば，三方管右側の流路の抵抗が小さく，三方管左側の流路抵抗が大きい場合には，シリンジによって排除された液体は抵抗が小さい右側の流路に多く流れ込むが，逆に三方管右側の流路の抵抗が大きく，三方管左側の流路抵抗が小さい場合には，シリンジによって排除された液体は抵抗が小さい左側の流路に多く流れ込む．極論で考えると，三方管右側の流路抵抗が左側の流路抵抗に比べて無視できるほど小さい場合には，液体容器内の液面高さは変化せず，結果的に $x \to x_1$．つまり PZT アクチュエータ単体で制御しているのと同じ細胞位置決め応答が期待できる．一方，三方管左側の流路抵抗が右側の流路抵抗に比べて無視できるほど小さい場合には，液体容器内の液面が大きく上昇し，その後マイクロ流路内の細胞が移動し，結果的に$x \to x_2$．この場合，細胞移動は，液面上昇分の重力ポテンシャルの増加分によってもたらされる．以上の考察は Fig. 5.9 に示されるような電気系の等価インピーダンス回路を用いて考えることもできる[35]．この場合，左右の抵抗値は，それぞれ液体容器及びマイクロ流路への流体の流れにくさを表している．さらに，コン

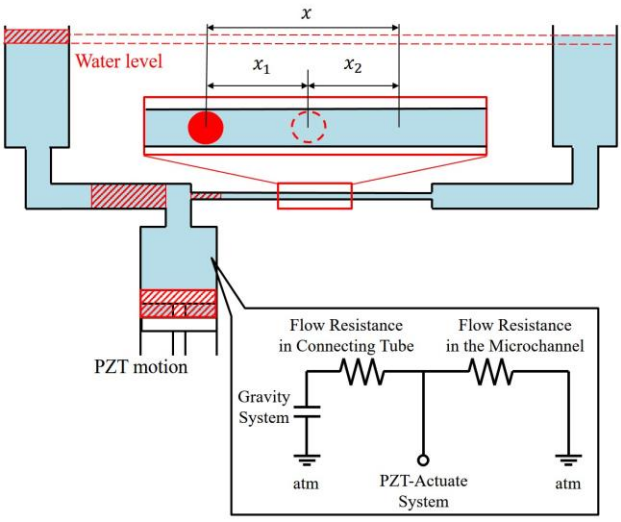


Figure 5.9. The coupled relation between two actuations in the hybrid system. When PZT pushes the fluid, two flows are generated to both the microfluidic channel and to the gravity-based pump on the slider. An analogy to electical circuit is shown[23].

デンサは液面上昇によって蓄えられた液体が重力によってマイクロ流路内に押し込まれるときのポテンシャルを表していると考えられる．このとき総移動量 $x = x_1+x_2$は質量保存の法則により，最終的には PZT アクチュエータのシリンジピストン移動量と 1 対 1 に対応する．ただし注意しないといけないことは，x_1，x_2に至る応答性が一致する訳ではない．この点を明らかにするためには，細胞の位置フィードバックを行わないで，オープンループで PZT アクチュエータだけを駆動したときに，細胞がどのような応答を示すのかを調べてみる必要がある．位置フィードバックをしないことにより，PZT アクチュエータだけによる細胞がどのような応答性を示すのか見えるだけでなく，干渉効果も実験的に評価することができる．

Fig. 5.9 の干渉効果が見れるように実験装置を改良し，PZT アクチュエータによるオープンループ制御下での細胞応答特性評価実験を行う．ただし，細胞の位置は高速ビジョンにより得られた画像データより取得する．また三方管の左側の流路抵抗を変えるため，チューブ管直径を 2 種類用いる．流路抵抗Rは断面積Aの二乗に反比例することが知られている[28].

$$R \propto \frac{1}{A^2}$$

したがって，両者のチューブに対して 1 オーダ以上の抵抗差があり，結果に大きな変化を与えることが予想される．

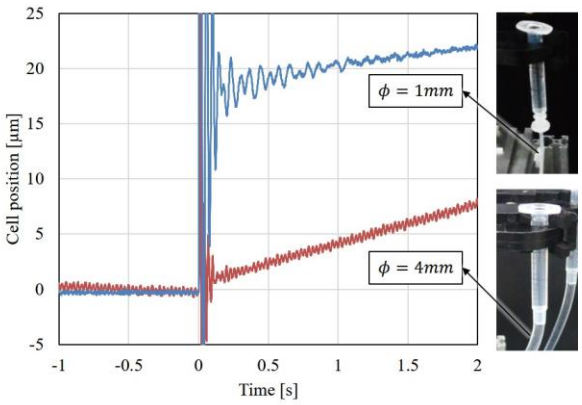


Figure. 5.10. The open-loop step response for the hybrid system with different connecting tubes. The diameters of the tubes are 1 mm and 4 mm which result in different flow reisistances as in the circuit shown in Fig. 5.9.

Fig. 5.10 はオープンループ制御下で PZT アクチュエータにステップ状の印加電圧を与えた場合の赤血球の応答を示した実験結果である．ここで青線と赤線はそれぞれ直径 1mm 及び 4mm の結果に対応している．Fig. 5.10 より，直径 1mm の場合，液体容器側のチューブ抵抗が大きいため，PZT アクチュエータのステップ入力に対し，直径 4mm の場合に比べ，全体的に応答性が早いことがわかる．さらに直径 4mm の場合，応答性が全体的に緩やかである．これは PZT のステップ入力によって押し出された液体の多くは液体容器液面の上昇に費やされるため，赤血球の動きはランプ応答に近くなっている．Fig. 5.10 から PZT アクチュエータが直接的に作り出す赤血球運動の時定数とスライダによって作られる液面変化に起因する赤血球挙動の時定数の間には，大きな差があり，これが結果的に両者の役割分担を明確にしているものと考えている．

5.9 あとがき

本章では，マイクロ流路内の細胞マニピュレーションに対して，圧力漏れ，ドリフト流に対して，PZT アクチュエータがストローク限界に至るのを防ぐために，スライダを追加したハイブリッドアクチュエータを提案し，その有効性を実験的に確認した．さらに，このハイブリッドシステムは流体を介してアクチュエータ間で干渉が起こっ

ている点を指摘するとともに．非干渉化に近づけるために流路直径を変え，流路抵抗を変えることが有効であることを示した．

6　同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーション

6.1　はじめに

本章では Fig. 6.1(c) のように，赤血球を次元を考慮した単純バネモデルに置き換えて評価しようとしている点に留意されたい．

マイクロ流路内での細胞マニピュレーションに対するニーズは高い．Sakuma ら[31]は，PZT と実時間高速ビジョンを用いて，最大周波数 100Hz，位置決め分解能 240nm を実現している．また Monzawa ら[25]は，隔壁型アクチュエーションという考え方を導入し，最大周波数 130Hz，位置決め分解能 240nm を実現している．一方，マイクロ流路内の細胞マニピュレーションは，流速は圧力差に比例するという Hagen-Poiseuille の流れに支配される．したがって，基本的にマイクロ流路内の圧力制御が正確に実現できれば，細胞マニピュレーションは高い位置決め制御ができるはずである．ところが，実際にはマイクロ流路内の圧力が正確に測れないというのが大きなネックになっている．圧力センサが組み込めない二つの大きな問題がある，一つは，PDMS チップ内マイクロ流路に簡単に埋め込めるレベルのものが容易に手に入らないという問題である．Tsai ら[38]は，この問題を踏まえて，PDMS マイクロチップの弾性を利用した圧力センサを提案し，細胞マニピュレーションへの応用を試みているものの，分解能や

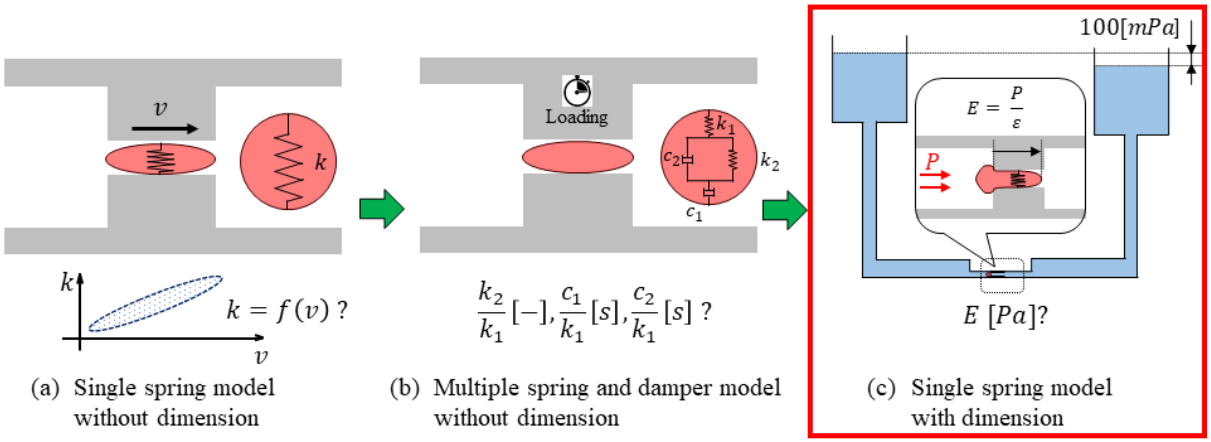


Figure 6.1. The evaluation on mechanical impedance of RBC. This chapter focuses on single spring model with force dimension such as [Pa], as shown in (c).

ドリフト面での問題を抱えている．もう一つは，圧力・電気変換部で介在するノイズにより，100mPa（細胞 1 個分の水柱ヘッド分に相当）レベルの分解能が出せていない．このように高分解能細胞マニピュレーションへのニーズは高いものの，未だに 100mPa の高分機能細胞マニピュレーションは実現できていない．

上記の問題に対応するため，ここでは同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーションを提案しようとしている．基本コンセプトはきわめてシンプルである．基本的に電気ノイズが介在する圧力センサは組み込まない．つまりセンサフィードバックを行わない．そのためにマイクロ流路出入り口間の圧力差は液体容器の高さによって 10μm の分解能を維持する．この分機能は 100mPa に相当する．さらに，その上でアクチュエータ動作時に発生する同相機械ノイズを土台を共有することによって除去する方式を採用し，最終的に分解能 100mPa を実現することを目指す．Figs. 6.2 はここで

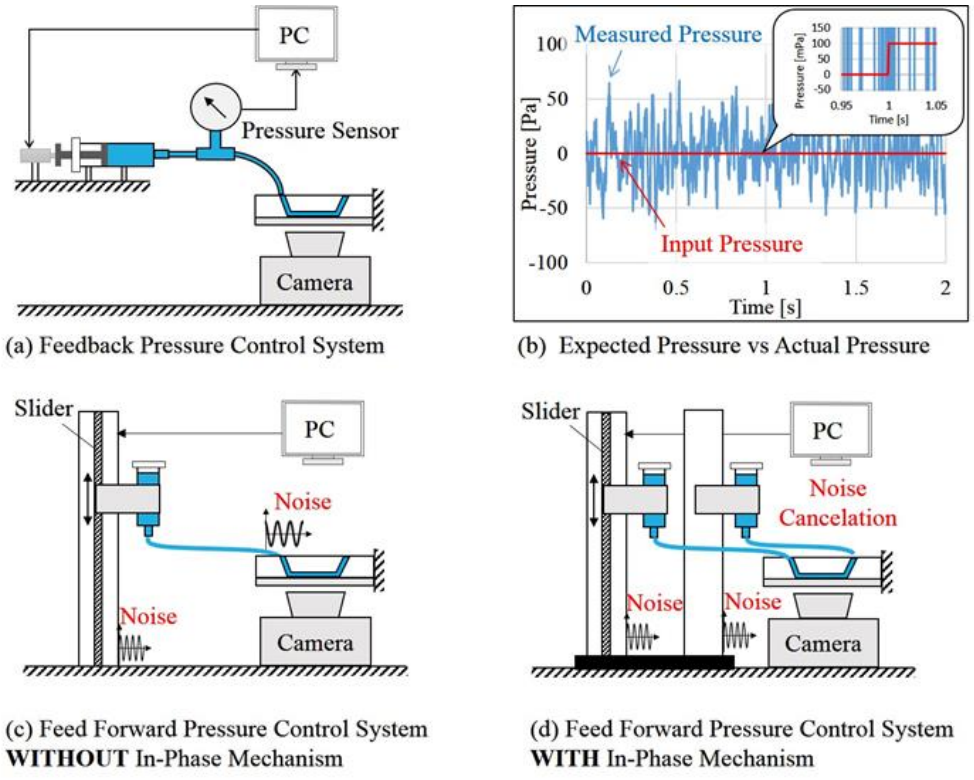
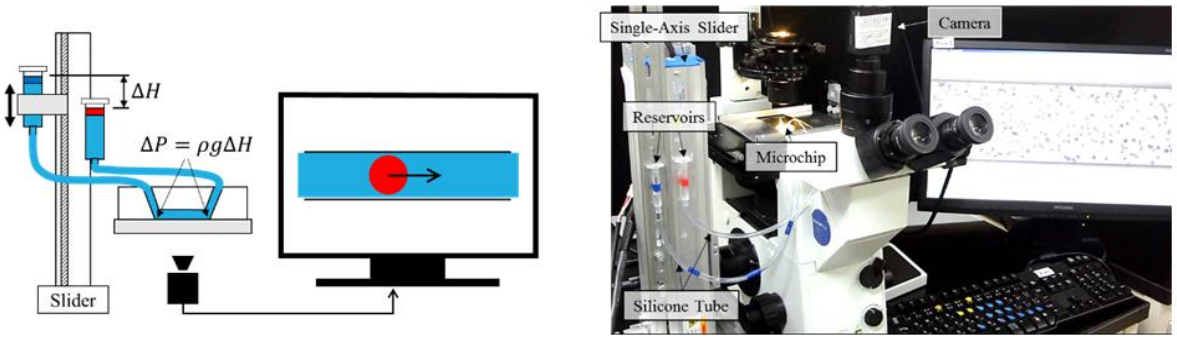


Figure 6.2. The conventional pressure system and proposed system. (a) Feedback controlled pressure system. (b) The control resolution is limited by sensor resolution. The blue signal is an example of measured pressure by a commercial pressure sensor. (c) Conventional gravity-driven pressure system. (d) The proposed system with in-phase noise cancellation.

提案する同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーションの全容を説明している．Fig. 6.2(a)は圧力センサを組み込んで圧力フィードバックによって細胞を制御する典型的な方法である，Fig. 6.2(b)は，このシステムに対して，目標値 100mPa を t=1sec 後に与えた場合の圧力センサ信号である．Fig. 6.2(b) からもわかるように，センサノイズに埋もれてしまい，圧力フィードバックは実質的には正常に機能していないことがわかる．

ここで Fig. 6.2(b)の青色信号は圧力センサからの出力信号に対してローパスフィルターを通した後の信号を示している．Fig. 6.2(b)からも分かるように，圧力分解能は約 50Pa で，分解能 100mPa にはほど遠いものがある．Fig. 6.2(c)は重力に準拠した圧力制御方式である．この場合，液体の入った容器の高さを制御するために水柱ヘッドを変えるより，マイクロ流路内の出入り口の圧力差を変え，細胞の速度を制御するというのが基本動作原理である．ただし，この場合，容器の高さを変更するアクチュエータを駆動する際に発生する機械振動に伴って発生する容器の高さ変動により，マイクロ流路内の細胞速度が変化することは否めない．そこで Fig. 6.2(d)のように液体容器をそれぞれマイクロ流路出入り口に接続し，それらを同じ土台に固定することによって，同相の機械振動の影響を排除し，分解能 100mPa を実現しようというのが，ここで提案する同位相ノイズ除去型重力差動型細胞マニピュレーションである．

本章では，はじめに Fig. 6.2(d)のアイデアに基づいて設計された実験システムの構成について説明する．ここでは PZT アクチュエータの代わりにストロークが大きいスライダ型アクチュエータを用いている．次に，同位相ノイズ除去の基本動作原理につい



(a) System diagram　　(b) A photo of the system

Figure 6.3. The overview of the experimental system [20]. (a) Microfluidic flow is monitored through a camera while the slider is controlled by the signals from the computer. (b) A photo of the whole setup.

て詳細に説明する．実験方法についてまとめた後，周波数特性解析結果から同位相ノイズ除去メカニズム導入の威力について，実験結果に基づいて説明する．さらに分解能 100mPa で赤血球が動いているエビデンスを連続写真によって示す．最後に，試作されたシステムを用いて，赤血球の狭窄部通過試験を行った結果についても言及している．

6.2 従来研究

ここでは特に重力を利用した細胞マニピュレーションに焦点をあてて，従来研究をサーベイしてみたい．マイクロ流路内の流れは一般に層流になる．この場合，Hagen-Poiseuille が指摘しているように，平均流速は圧力差に比例するという明快な理論がある．つまりマイクロ流路内の流速はマイクロ流路内出入り口間の圧力差によって完全に規定することができる．この理論は圧力センサを設置しなくても，液体容器の高さを変えるだけで，マイクロ流路内の細胞を容易に制御できることを示唆している．このような背景から，重力を利用したマイクロ流路内の細胞マニピュレーションの研究は比較的多い．例えば Zhang ら[47]は回転テーブル上に置かれた液体容器からの重力で落下する液滴をマニピュレーションする問題を取り扱っている. Kang ら[16]は，アームが回転したときの重力変化を利用して微小物体を操る実験を行っている．Yamada ら[44]は，一定高さに設置された液体容器を設置し，重力を使って液体を流すことによって，その中に存在している細胞をカウントするシステムを提案している．このように重力を使ってマイクロ流路内の細胞を駆動する研究は他にもある[26], [45]．本研究でもマイクロ流路内の細胞マニピュレーションに重力を用いていることを付記しておきたい.

6.3 同相ノイズ除去型重力差動型圧力制御システム

Figs. 6.3 (a), (b)はそれぞれ提案するシステムの構造と写真を示している．マイクロ流路内の流れは Fig. 6.3(a)に示される二個の液体容器の高低差によって作られる圧力差によって引き起こされる．この圧力差は Pascal の次元で表示すると，式(6.1)のようになる．

$$\Delta P = \rho g \Delta H \tag{6.1}$$

ただし，$\Delta P, \rho, g$ 及びΔHは，それぞれ圧力差，流体密度，重力加速度，及び液体容器内液面の高さの差である．本研究で用いている液体容器およびマイクロ流路の断面

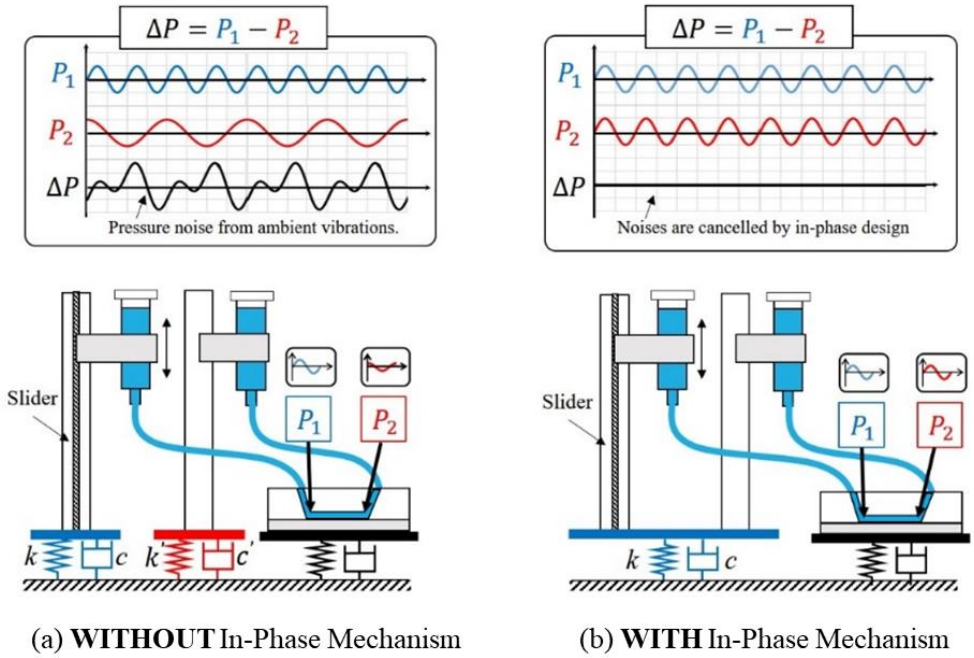


Figure 6.4. The idea of in-phase noise cancellation. (a) without in-phase noise cancellation. (b) with in-phase noise cancellation.

積はそれぞれ$2.83 \times 10^7 \mu m^2$及び$3.00 \times 10^1 \mu m^2$に設計されているため，その面積比の違いは10^6のオーダになっている．そのため，液体容器間の液柱差ΔHはマイクロ流路内流速に敏感に影響を与えるものの，マイクロ流路内の流れが，液柱差ΔHに影響を与えることはないと考えてよい．例えば，流量$600\mu m^3/s$はマイクロ流路内の細胞に約$20\mu m/s$の速度を作り出す流量に匹敵する一方で，液柱差ΔHに対しては$0.02nm/s$のスピードしか引き起こさない．Fig. 6.3(b)に示されるシステム全体像は，マイクロ流路を内蔵した PDMS チップ，顕微鏡(IX71, Olympus Co.)，二個の液体容器，及びスライダ(RSH205, Misumi Co.)によって構成されている．スライダの位置決め分解能は 10 μm で，これは 100 mPa (assuming $\rho = 10^3\ [Kg\ m^{-3}], g = 10\ [m\ s^{-2}], \Delta H = 10^{-5}[m]$)に匹敵する．スライダの最小分解能で赤血球が駆動されることが，本研究のねらいである．マイクロ流路の出入り口はそれぞれ液体容器にシリコンチューブを介して接続されている．液柱差ΔHは，マイクロ流路入口側に接続された液体容器をスライダで上下させることによって作り出される．スライダ本体は，アルミウムと鋼で組み立てられており，基本的に剛体とみなすことができる．シリコンチューブの長さ，外径，及び内径は，それぞれ 300mm, 6mm 及び 4 mm である．さらに二つの液体容器は同じ土台上に設置され

ている．したがって，スライダ駆動時に発生する微小機械振動は両液体容器に同位相で伝達される．これが同相ノイズ除去メカニズムの原点になっている．

Figs. 6.4(a), (b)はそれぞれ同相ノイズ除去機構がない場合とある場合の構造を具体的に示した図である．両者の違いは，液体容器が固定されている土台が異なっているか，それとも共通になっているかだけである．Fig. 6.4(a)の場合，それぞれの容器は異なるダイナミクスを有する台上に固定されているのに対し，Fig. 6.4(b)の場合，両容器とも同じダイナミクスを有する土台上に固定されている．さらに具体的に言うと，Fig. 6.4(a)の場合，それぞれの容器はバネ定数とダンパー (k, c) の土台または (k', c') の土台上に載っているのに対し，Fig. 6.4(b)の場合，両容器ともバネ定数とダンパー (k, c) の土台に載っている．そのため，Fig. 6.4(b)の場合，土台に入る同一の振動源に対しては，機構的な差分動作が機能し，マイクロ流路内流体に影響を与えない．ここで，マイクロ流路出入り口の圧力P_1 と P_2を使って説明してみよう．Fig. 6.4(a)のように液体容器が別々の土台に載っている場合，それぞれの土台の固有振動数の違いによって，液体容器の運動は異なる．結果的に容器内液体の表面位置の時間的変化は両者で異なり，土台のダイナミクスの違いがそのまま圧力差ΔPに反映される．一方，Fig. 6.4(b)のように液体容器が同じ土台に載っている場合，土台の固有振動数が同じになるため，液体容器の運動は同相になる．結果的に土台にのる同相の機械振動が作り出す容器内液体の表面位置の時間的変化は両者で同じになり，圧力差ΔPに反映されない．以上が，同相ノイズ除去の原理である．この同相ノイズ除去は，赤血球マニピュレーション分解能100mPa を実現する上で大きな武器になることを付記しておきたい．

6.4 実験

Fig. 6.3(b)に示す実験装置を使って評価実験を行う．最初に同相ノイズ除去効果を確認するため，マイクロビーズをトレーサー代わりに用いて実験を行う．次に赤血球を用いて，圧力差と速度との関係について調べる，なお赤血球提供者には事前に実験目的について読んでいただき実験に協力していただいている．血液サンプルは実験開始 30 分前に実験室に運び込まれる．さらに運び込まれた血液は生理食塩水(NaCl = 0.9%) で 100:1 に希釈されてから評価実験に使われている．圧力ゼロ($\Delta P = 0$ かつ$\Delta H = 0$)はマイクロ流路内のトレーサー（赤血球またはマイクロビーズ）の速度がゼロになった

時点で定義される．その後，トレーサーの運動は，高速カメラによって記録され，Image-Processing Toolbox in Matlab を使って解析する．

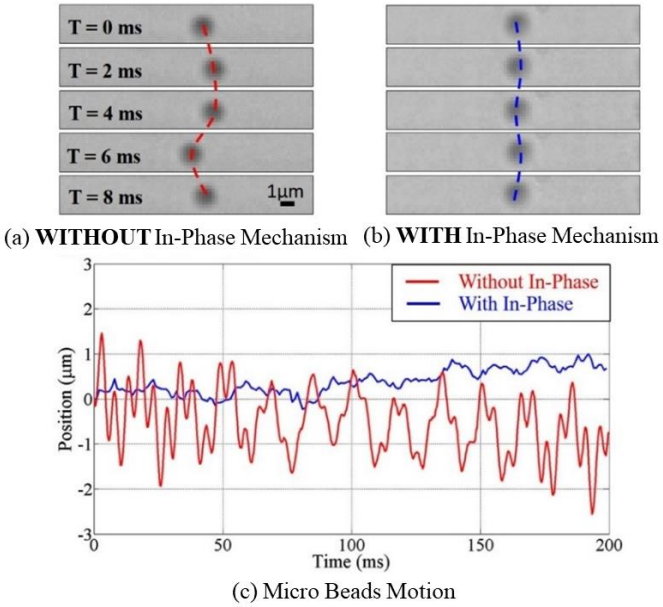


Figure 6.5. The motion of a microbead. (a) A microbead motion in the system without in-phase noise cancellation. (b) A microbead motion in the system with in-phase noise cancellation. (c) The tracked microbeads positions with respect to time.

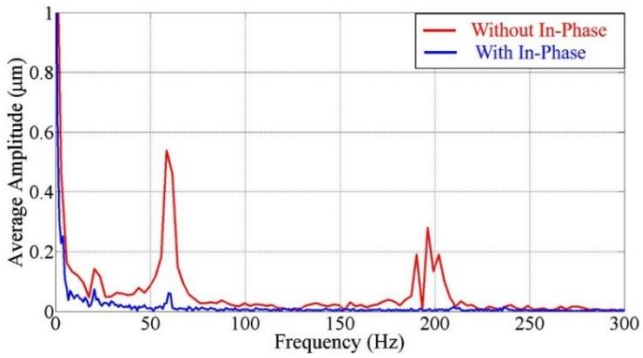


Figure 6.6. The frequency spectrum without and with in-phase noise cancellation.

Figs. 6.5(a) , (b)は，それぞれ同相除去を使わなかった場合と使った場合のマイクロ流路内のマイクロビーズの動きの連続写真である．なお，実験中，意図的なノイズは一切加えられていない．破線はマイクロビーズの軌跡を追跡したものである．Fig. 6.5(c)は，同相ノイズ除去を行っていない場合と除去した場合のマイクロビーズの運動を時

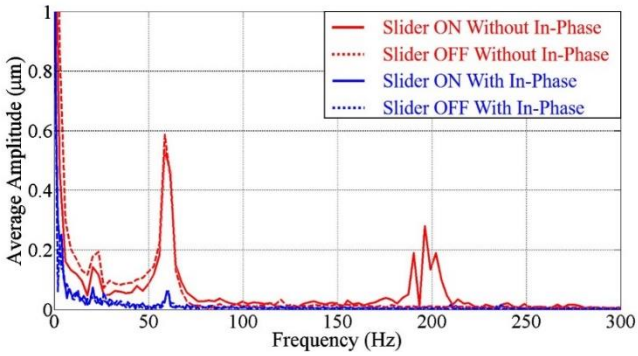


Figure 6.7. The frequency spectrum without and with slider motor power turning on.

間に対してプロットした図である．これより，同相ノイズ除去を行っていない場合，マイクロビーズには振動振幅が約 1μm のジグザグ運動がのっているものの，同相ノイズ除去を行った場合，ジグザグ運動の振幅は 1 μm 以下になっていて，マイクロビーズの振動は陽には見えなくなっている. Fig. 6.5 より，同相ノイズ除去を行った場合には，マイクロビーズの振動はうまく除去できていることがわかる．

Fig. 6.6 は，高速フーリエ変換によって Fig. 6.5 の信号に対するフーリエスペクトルをとった図である．赤色と青色のデータは，それぞれ同相ノイズ除去をしなかった場合のスペクトル，及び同相ノイズ除去を行った場合のスペクトルを表す．Fig. 6.6 の赤線から，20Hz, 60Hz , 180Hz において明確なピークの存在が確認できるものの，同相ノイズ除去を行った場合には青線からわかるよう，これらのピークは収まっていることが確認できる．実験環境から考えて，これらのピークは，それぞれ顕微鏡ファン，スライダの電源供給系，及びスライダの PWM コントローラから出ている可能性がある．

これらの振動ノイズ源は，ごく普通に存在していると考えられる．一方で，これらのノイズを除去することなしに精密な圧力制御や高感度細胞マニピュレーションを行うことはできない．

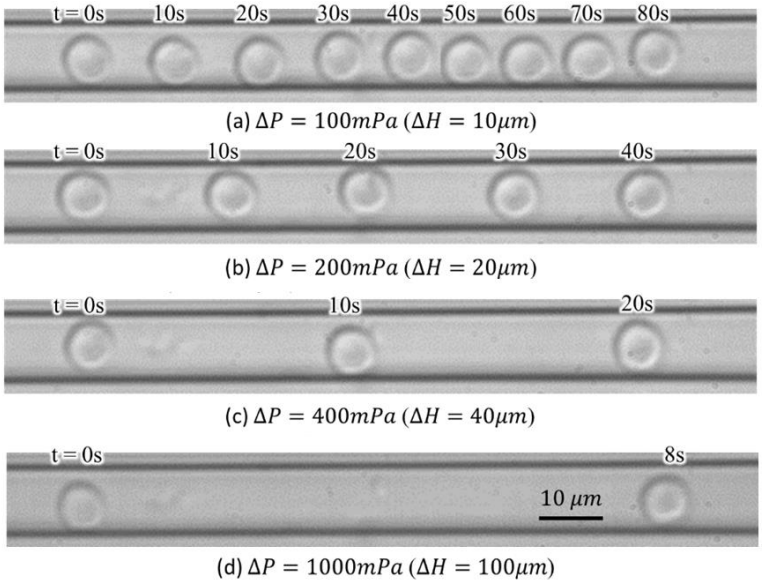


Figure 6.8. Series of photos of cell position with respect to time under various ΔH

Fig. 6.7 はスライダの電源を ON, OFF した場合の周波数スペクトラムの変化を調べた図である．ここで青色と赤色はそれぞれ同相ノイズ除去を行った場合，及び行わなかった場合の結果を表している．また実線及び破線は，それぞれスライダの電源を ON, OFF した場合に対応している．興味深い点は，周波数 180Hz のピークはスライダの電源を OFF にしたときに消滅している点である．これは，周波数 180Hz の振動はスライダのコントローラによって作り出されている可能性が高いことを示唆している．加えて，同相ノイズ除去機能をもったシステムに対しては，スライダ電源 ON, OFF の影響は小さい．以上より Figs. 6.5, 6.6, 6.7 の結果は同相ノイズ除去機構の有効性を強く支持していることがわかる．

Fig. 6.8 は，赤血球をマイクロ流路内に流したときの画像イメージを一定の時間間隔で取得した連続写真である．ここで Figs. 6.8(a), (b), (c) 及び (d)は，それぞれ水柱の高さΔH = 10μm, 20μm, 40μm 及び 100 μm の下で赤血球の動きを観察している．また各写真のトップには各写真が取得されたときの時刻が表示されている．水柱ΔHは，マイクロ流路出入り口間の圧力差ΔPに対応している．赤血球の速度は，任意の 2 点間の距離と時間から容易に評価することができる．例えば，Figs. 6.8(a), (c)の左端から右端まで赤血球が移動する時間は，それぞれ 80sec 及び 20sec である．もし二点間の移動距離が

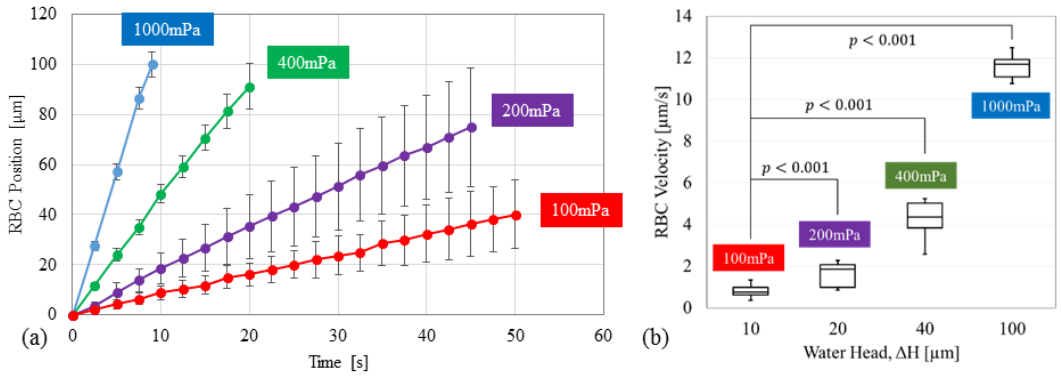


Figure 6.9. RBC velocity analysis. (a) The tracked cell position with respect to time under different ΔH. (b) RBC velocity distribution based on tracked results.

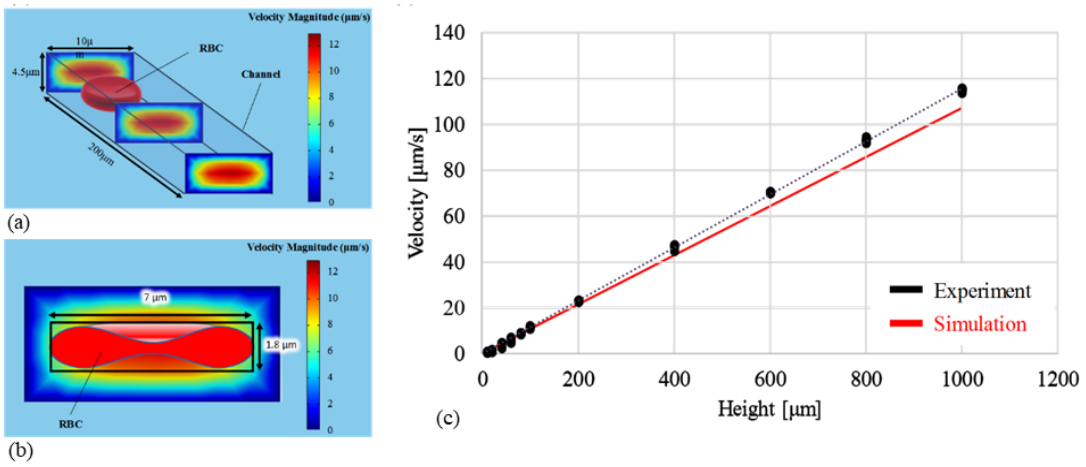


Figure 6.10. The comparison between theoretical and experimental results.

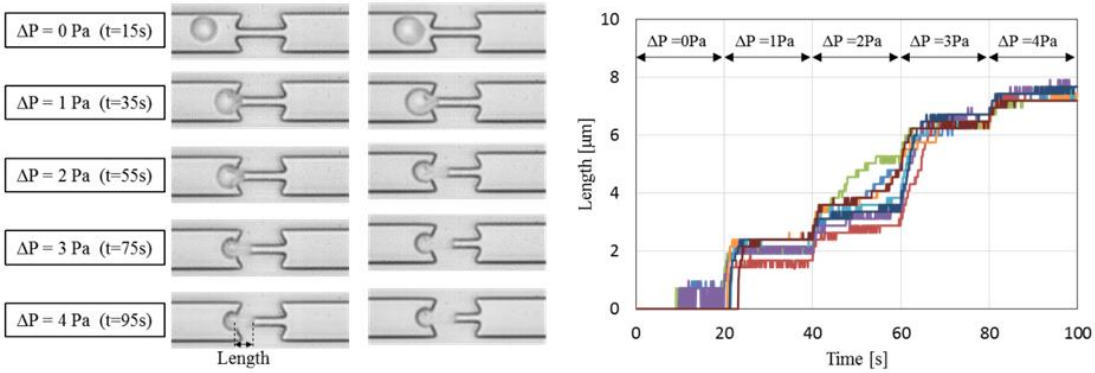
等しいとすると，Fig. 6.8(c) の赤血球は Fig. 6.8(a)の赤血球に対し 4 倍速いと言える．Fig. 6.8 より，Δ*H*が大きくなるにつれて，流体中の赤血球の動きは規則的に速くなっている様子が見てとれる．

Fig. 6.9(a)は Fig. 6.8 に示される水柱条件下での赤血球の位置と時間との関係を示した図である．カメラの最大記録フレームレートは 250 frames/sec (fps)である．赤血球の移動速度を評価する上では特に問題のない分解能である．赤血球の位置はイメージプロセッサにより自動的に追跡される．なお位置の原点は赤血球が最初に検出された位置としている．Fig. 6.9(a)は 100mPa から 1000mPa までの圧力レンジの下で，赤血球速度がほぼ一定になっていることを示している．

赤血球の位置と時間に対する線形回帰の値は平均値 0.994 で全体としては 0.939 から 0.999 の間に分布している．この結果は，赤血球がほぼ一定速度で移動するため，圧力変動が小さいことを意味している． Fig. 6.9(b)は，Fig. 6.9(a)から算出された赤血球の平均速度である．速度に対して統計処理を行った結果，一定ΔH下で，赤血球速度変動は観察されるものの，異なった水柱ΔHの下での赤血球速度に対して p<0.001 での有意差が認められた．100mPa の圧力差においても，p<0.001 の有意差が得られているのは驚きである．この結果は，100mPa の圧力差が細胞速度に明確な変化を与えていることを示している．この圧力差は赤血球直径分の水柱に対応し，圧力センサフィードバックでは対応できないことを付記しておきたい．このように液体容器の水柱差を用いる赤血球速度制御は，開ループ制御でもきわめて高い分解能の実現が可能であることがわかる．

Figs. 6.10(a), (b)は流れのシミュレーション結果で，Fig. 6.10(c)はシミュレーション結果と実験結果を比較したものである．ただし，シミュレーションにおいては赤血球の存在を考慮せず，あくまでもマイクロ流路内の流れシミュレーションに特化している．また，シミュレーションは市販のソフト COMSOL (Multiphysics Co.)が使われている．Fig. 6.10(a)は圧力差$\Delta P = 1Pa$ ($\Delta H = 100\ \mu m$相当)のもとでの速度分布が示されている．ここで，各断面図上の色は，右側に表示されたカラーバーに基づいた速度の大きさに対応している．なお，流体の物理量は生理食塩水に合わせて設定されている．またマイクロ流路の高さ及び幅は，実験装置と合わせて，それぞれ 3.5μm 及び 10μm に設定されている．さらに Fig. 6.10(c)におけるシミュレーションと実験との比較は，シミュレーションにおける赤血球の速度はマイクロ流路断面平均速度と一致するという仮定の下で行われている．ただし，この場合の断面は赤血球の大きさを考慮し，高さ及び幅はFig. 6.10(b)に示されているように，それぞれ1.8μm及び7μmとしている．またFig. 6.10(c)の横軸，縦軸はそれぞれ水柱ΔH，赤血球速度に対応している．

Fig. 6.10(c)における点及び実線は，それぞれ実験結果及び水柱ΔH を 100mPa から 10Pa まで変化させたシミュレーション結果を示している．実際には実験結果の方がシミュレーション結果より多少速度が大きくなっているものの，実験結果とシミュレーション結果は比較的よく一致している．以上の結果は，mPa オーダでの赤血球マニピュレーションができることをシミュレーションの観点からも支持している．繰り返しになるが，圧力センサフィードバック方式ではきわめて実現困難なレベルの高分解能が提案手法で実現できている点を強調しておきたい．



(a) Example of RBCs under small pressures　　(b) Insertion length versus time with pressure increments

Figure 6.11. Applications on precise cell evaluation by pressure increments. (a) Two examples of RBC deformation under different amount of applied pressures. (b) Tracked insertion length.

Fig. 6.11 は赤血球の変形能試験結果である．ここでは，試作した微小圧力印加システムを用いて，狭窄部を含んだマイクロ流路出入り口間に微小圧力を印加し，赤血球を一辺 3.5μm の正方形断面を有する狭窄部を通過させ，そのときの印加圧力と狭窄部内における赤血球の形状変化を観察している．Fig. 6.11(a)は印加圧力を 0 Pa から 4 Pa まで 20 秒毎に 1Pa 増加させた場合の赤血球の様子をカメラ撮影した結果である．圧力増加分を 1Pa にした理由は，これ以下だと赤血球の変形がほとんど見られなかったことによる．また 20 秒間の待ち時間を与えることにより，圧力印加に対して赤血球が十分変形する時間的余裕を与えている．Fig. 6.11(a)の左側の赤血球は右側の赤血球に対し，相対的に小さい．そのため右側の赤血球の方が狭窄部に侵入しづらくなっている様子が観察できる．特に，右側の赤血球では，4 Pa において狭窄部の左側に存在する未侵入の体積が大きいことがわかる．Fig. 6.11(b)は，狭窄部内部への侵入長さと圧力印加との関係を 8 個の赤血球に対して算出した結果である．ここで侵入長さは，各圧力印加に対して，平衡状態に到達した時点での狭窄部内の赤血球の侵入長さとして定義さ

れて，赤血球の変形能指標として用いている．なお侵入長さの計測分解能は画素 1 ピクセル分で 0.24μm に相当する．Fig. 6.11(b)から，同じ圧力印加条件であっても，赤血球毎に異なった応答を示していることがわかる．この差は，特に圧力印加が 3 Pa 以下の時に顕著である．赤血球の侵入長さは，圧力印加が 4 Pa 以上では同様な応答を示している．このように圧力印加分解能が高い本提案システムは今後の赤血球変形能試験にも応用できる可能性を示唆している．

6.5 考察

1Pa 毎に圧力を 0 Pa から 4 Pa まで上げただけで赤血球の変形能に微妙な違いが生じることを実験的に明らかにしている．この最小圧力単位 1Pa というのは水柱で100 μm に相当し，赤血球 10 個分の水柱に対応している．ここで赤血球のヤング率について見積もってみよう．ヤング率 E の定義により，$\sigma = E\varepsilon$．ここで σ, ε はそれぞれ応力，ひずみである．赤血球が狭窄部入口で変形をはじめる最小圧力単位ΔP は 1Pa である．このとき，赤血球の変形は Fig. 6.11 より 1〜2μm のオーダと見積もることができる．赤血球の大きさが 6〜8μm であることを考えると，ε =0.12〜0.25．これよりヤング率は，E=4.0〜8.3Pa．この結果は，郡ら[18]が，マイクロピペットを用いた引っ張り試験で実験的に計測された 4〜118Pa に包含されているだけでなく，幾何平均 16Pa ともきわめて近い値になっている．このように本システムを用いて推定した赤血球のヤング率が従来研究と符合する最大の理由は，本システムが圧力印加分解能 100mPa を有し，この分解能が赤血球のヤング率最小値の 1/40 に対応していることによるものであると考えている．繰り返すが，100mPa，細胞 1 個分の水柱に対応する驚異的な圧力分解能が実現でき，かつ同相ノイズ除去機能を備えた赤血球マニピュレーションシステムは，筆者が調べた限りにおいて開発例がない．

6.6 あとがき

二つの液体容器の高低差が作り出す圧力差をマイクロ流路出入り口間に与えてマイクロ流路内の赤血球を操る高分解能・同相ノイズ除去機能を有する重力差動型細胞マニピュレーションシステムを提案し，はじめに液体容器を同一土台状に設置することにより，同相ノイズがとれることを実験的に検証した．次に赤血球 1 個分の水柱に相当する 100mPa 分解能で細胞速度が変えられること，さらに狭窄部を組み込んだマイクロ流路に対して赤血球 10 個分の水柱に相当する 1Pa の圧力分解能で 0 Pa から 4 Pa まで

20 秒毎に 1Pa 増加させた場合の狭窄部の赤血球の変形挙動を観察し，赤血球の認識可能最小変形（1～2μm）がマイクロ流路出入り口間圧力差 1Pa で引き起こされることを明らかにした．これらの基礎データに基づいて，赤血球のヤング率が 4.0～8.3Pa であることを算出し，従来実験結果との整合性を確認するとともに，赤血球のヤング率がきわめて簡単な方法で計測できることを明らかにした．

本研究で提案するシステムは計測方法が簡単な上に分解能が高くしかもスループット向上が見込めるため，健常者と患者の赤血球変形能をヤング率という指標で診断するといった医療応用へ展開が期待される．

7　考察

4 章までの実験及びモデル構築を通じてわかったことは，マイクロ流路を内蔵する PDMS チップに外付けでマクロアクチュエータを取り付け，シリンジポンプを駆動し，流体を介してテストチャンネル内の赤血球マニピュレーションを行う場合に，アクチュエータ位置を入力 $X_1(s)$ とし，赤血球位置 $X_2(s)$ を出力としたときの伝達関数は，$X_2(s)/X_1(s)$～1/s と見なせる[22]．つまり赤血球位置はアクチュエータ位置の時間積分に比例するというきわめて簡単な伝達関数になる．ところが周波数が 100Hz を超えたあたりでゲインが増加する周波数帯域が存在することもわかってきた．3 章の式(3.4)には極が存在しているため，共振点的な挙動を起こしても，一向に不思議ではない．ではそのような共振挙動は PDMS マイクロチップ内壁の質量・剛性が本当に関与しているのだろうか．残念ながら，これまでにこの原因を突き止めた研究はない．ここではより厳密に入出力特性を取得するため， 顕微鏡を通して PZT の変位を高速カメラで直接計測し，それをアクチュエータ入力とする．PZT の変位を観察する高速カメラを導入した実験システムの外観を Fig. 7.1 に示す．2 台目の高速ビジョンを追加したことを除けば，それ以外は 3 章で用いた実験システムと同じである．

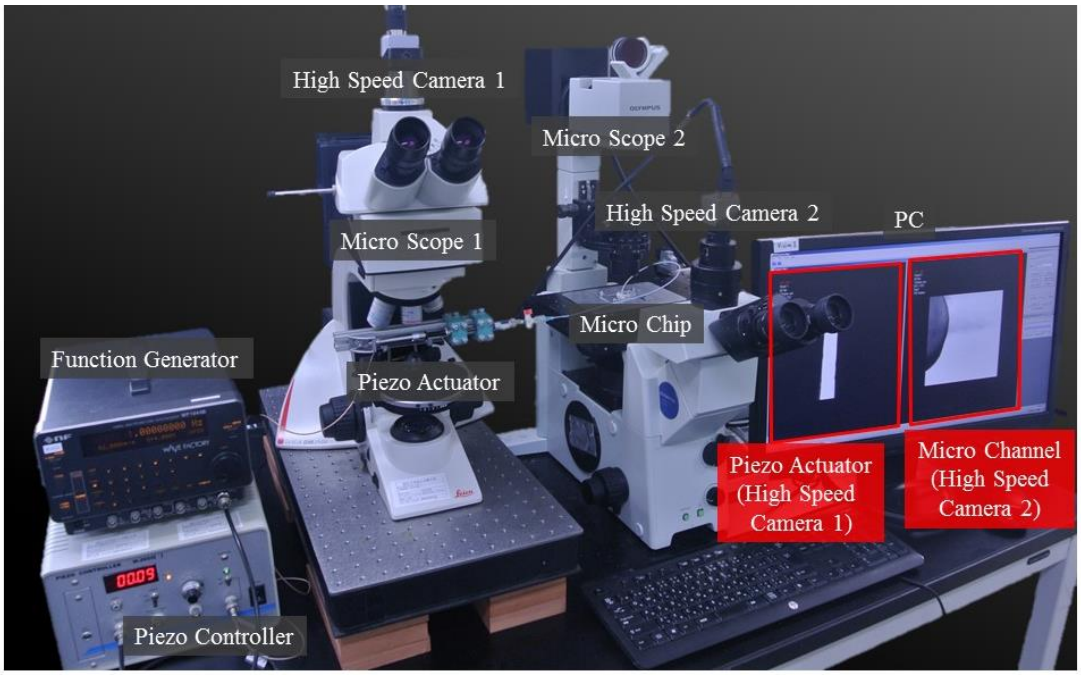


Figure 7.1. An overview of experimental system with double visions [37].

ここでは PDMS マイクロチップの共振を演じている主役を突き止めるため，以下のようにデフォルトバージョンと 2 つのオプションの実験結果を比較する．

・デフォルトバージョン : 第 3 章，第 4 章と同様のシリコンチューブと PDMS を用いて実験を行う (シリコンチューブ長さ : $L_0 =$ 30cm，PDMS : SILPOT 184).

・オプション 1 : シリコンチューブの長さをデフォルトバージョンの 10 倍にして実験を行う (シリコンチューブ長さ : $L_1 = 10\,L_0 =$ 300cm，PDMS : SILPOT 184).

・オプション 2 : 使用する PDMS をより硬いものに変えて実験を行う (シリコンチューブ長さ : $L_2 = L_0 =$ 30cm，PDMS : X-32-3094-2).

2 つのオプションから得られた結果を比較することで，シリコンチューブ長さとマイクロ流路の壁面の弾性が，どうゲイン特性に影響を与えるかを検討する．なお，シリコンチューブを伸ばすことは，第 3 章の Fig. 3.3 の弾性要素kを減少させる操作であり，使用する PDMS を硬くすることは， Fig. 3.3 における弾性要素 k, k_2 を増大させる操作である．

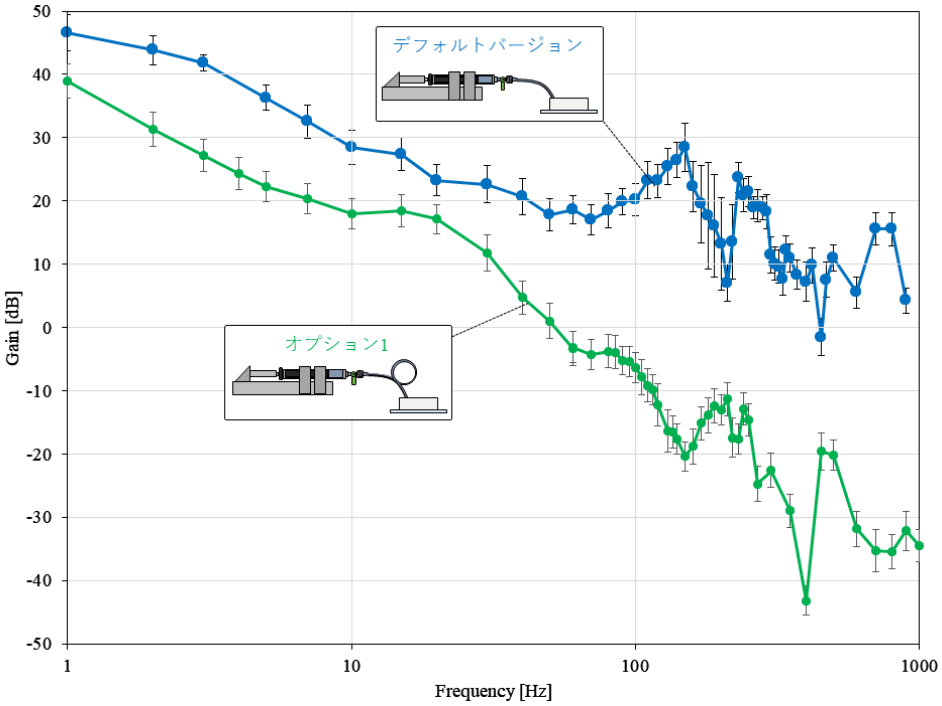


Figure 7.2. Gain characteristics with respect to frequencies. (blue line : default version, green line : option 1)

Fig. 7.2 はデフォルトバージョンとオプション 1 の実験結果である．青線及び緑線はそれぞれデフォルトバージョン及びオプション 1 の実験結果である．両者を比較したとき，オプション 1 のゲイン特性はデフォルトバージョンに比べ，グラフ全体が下がっており，共振周波数が小さいこと（15Hz 近傍）がわかる．この現象は式(7.1)の共振周波数を表す式と，式(7.2)の低周波数領域におけるゲイン特性の式で説明することが出来る．なお，導出については第 3 章の式(3.4)と付録 A の式(A5)を参考にされたい．

$$\omega_2 = \sqrt{\frac{k + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 k_2}{M + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 m}} \tag{7.1}$$

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{A_1}{A_2} \frac{1}{1 + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 \frac{k_2}{k}} \tag{7.2}$$

シリコンチューブが長い場合，マイクロ流路入り口側の PDMS 壁面の弾性kのみが小さくなるので，式(7.1)の分子が小さくなり，共振周波数が下がる．さらに式(7.2)の分母のk_2/k が大きくなるので，分母全体が大きくなりゲインも下がる．

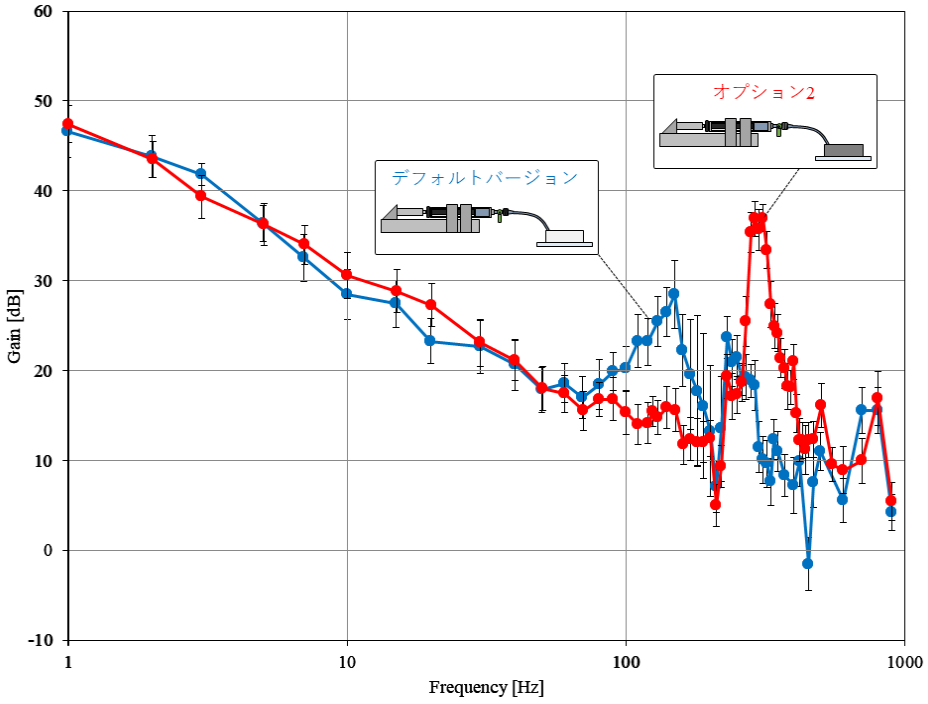


Figure 7.3. Gain characteristics with respect to frequencies. (blue line : default version, red line : option 2)

Fig. 7.3 はデフォルトバージョンとオプション 2 の実験結果である．青線及び赤線はそれぞれデフォルトバージョン及びオプション 2 の実験結果である．両者は共振周波数を迎えるまで同様の傾向を示しているが，オプション 2 の共振周波数はデフォルトバージョンに比べ2倍近く大きくなっている．この現象について，式(7.1)と式(7.2)を用いて説明する．マイクロ流路内の壁面の弾性k, k_2が大きくなった時，式(7.1)の分子は大きくなるので，共振周波数は上がる．では，なぜオプション 2 のように PDMS を硬くしたときも，低周波数領域でゲイン特性が変化しないのだろうか．低周波数領域では慣性の影響が小さくなり，一般に入力振幅は大きくなりやすい．入力振幅が大きくなると，マイクロ流路内の内圧が上がりやすくなる．ここで，マイクロ流路内のバネ特性が変位に応じて硬くなる非線形特性を有すと仮定すると，振幅が大きくなると，デフォルトバージョンもオプション 2 もやがて硬いバネ特性領域に突入してしまうと考えられる．これが低周波数領域でゲインが変化しない理由であると考えている．この考察によって，実験結果の傾向をうまく説明することが出来る．

以上でマイクロ流路内壁面の弾性要素を変化させることで，ゲイン特性を大きく変化させられることが分かる．さらに興味深いことは，シリコンチューブの長さを変えることで，マイクロ流路の入り口側の弾性のみを変えられることであり，これによりゲインと共振周波数の両方を変えることができる．このように二つのオプションを追加することで PDMS マイクロ流路内の細胞マニピュレーションに関する設計指針はより明快に説明することが出来ることを強調しておきたい.

.

8　まとめ

細胞の力学特性を調べる上でスループットを上げ，短時間で計測実験を終了することはきわめて重要である．例えば，赤血球の場合，検査用サンプルは動脈ではなく静脈から取得される．静脈側の赤血球は抹消血管を通じて細胞に酸素を提供し，代わりに二酸化炭素を肺に運び，酸素と交換する任務を背負っている．別の見方をすると，静脈内の赤血球は酸素をほしがっている訳である．そのため空気中に置かれた赤血球は酸化赤血球になりやすく力学特性も変わりやすいと言われている．したがって，スループットが低い原子間力顕微鏡（AFM），マイクロピペット，レーザートラップ法では，計測原理は確認できるものの，3 桁のデータ数を 1 時間以内で確保することはむつかしい．本研究で対象にしているマイクロ流路を用いる方法は，高スループットを確保するという意味では適していると言えよう．

マイクロ流路を用いた細胞の変形能計測には流路出入り口間の圧力を一定に保った状態で，マイクロ流路通過速度（または通過時間）に着目する受動的手法と，細胞ストレス試験のようにアクチュエータによって細胞を積極的に操作する能動的手法がある．本論文では，特に，能動的手法の場合に重要となるマイクロ流路の入出力周波数伝達特性をオープンループで調べることからはじめ，マイクロ流路を用いた細胞マニピュレーションという切り口で以下の点を明らかにした．

(1) 積分特性＋共振特性：入出力特性は概ね$X_2(s)/X_1(s)$～1/s と見なせる積分特性と一部に共振特性を含んだ形で表せる[22]．つまり共振点までは細胞位置はアクチュエータ位置の時間積分に比例するというきわめて簡単な伝達特性と見なせる．
(2) マイクロチップの硬さ調整による共振点設計：共振点はマイクロチップの硬さと密接な関係があり，マイクロチップを硬くすると，共振点を上げることができる．このことは，フィードバック系を構成したときの安定な動作を広げることができ，スループット向上に貢献する[37].
(3) ハイブリッドアクチュエータ：アクチュエータとして細胞操作に一般的に用いられているピエゾアクチュエータ（PZT）は高速性には適しているものの，ストローク（40μm）に難点があり，マイクロ流路内で発生するドリフト流に対抗して長時間細胞の位置保持を行うことがむつかしい．この難点を克服する方法として PZT に加えて，長ストロークが確保できるスライダを組み込んだハイブリッドアクチュエータを提案し，その有効性を実験的に示した[23], [19].

(4) 超高分解能（100mPa）細胞マニピュレーションシステムの開発：細胞の硬さを配慮したマイクロ流路通過特性を調べる上で，1 Pa 以下の圧力分解能が必要である．このニーズに応えるため，同相ノイズ除去機能を付与した 100mPa 細胞マニピュレーションシステムの開発を行い，実証実験によりその有効性を確認した[20].

一方，1000Hz 以上の高周波数領域では，入出力特性が必ずしも一様な傾向に従う訳ではなく，特に 1000Hz, 2000Hz, 3000Hz 付近の振る舞いは未だ現象が明らかになっていない．細胞力学特性計測の高スループットはマイクロ流路の伝達特性と密接な関係があるため，今後は高周波数帯域での実験的エビデンスを得るという視点で研究を進めていきたい．また，6 章で開発したシステムを使って赤血球のヤング率[Pa]のオーダが見積もることができることを示し，簡単なシステムで赤血球評価に次元を組み込むという新たな学術分野を切り開くことにも成功している．

最後に，このようなマイクロチップを使った細胞変形能計測ができるようになった場合の応用例について述べておきたい．心筋梗塞等で発作が起こった場合，血管弛緩剤が投与され，心臓に負担がかからないような処置がとられる．一方で，心臓の負担

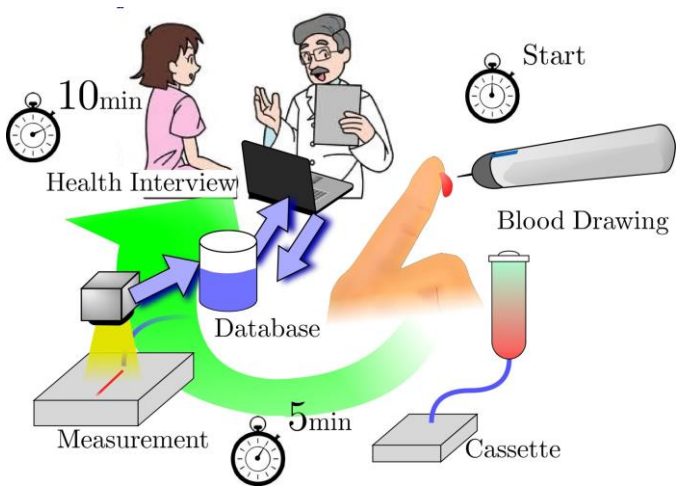


Figure 8.1. Illustrative image of future medical diagnosis for red blood cell.

を下げるもう一つの方法は，赤血球を柔らかくし，抹消血管を通りやすくする方法が考えられるが，後者の方はまだ赤血球の変形能を上げる効果がある薬剤自体が世の中に出回っていない状況である．現在の健康診断の項目には赤血球採血は含まれているものの，検査項目の中に赤血球変形能といった赤血球の力学特性まで含まれていない．将来的には，例えば Fig. 8.1 のように採血直後に一滴の血液をマイクロチップ内に入れ，

変形能試験を行えば，10 分後には医師との医療面談においてその結果に対するコメントが出せるような日がくるかもしれない．このような未来の医療診断に対して，本研究で取り扱っているシステム構成は診断装置の低コスト化に貢献できる点について触れておきたい．本研究で対象にしている装置は大きくマクロ高速アクチュエータ，高速ビジョン，顕微鏡，及びマイクロチップである．このうち，マイクロチップはディスポーザルで使い捨てタイプとなっているため，一度システムを構築してしまえば，その後は一人あたりにかかるコストはマイクロチップ分＋ランニングコストになる．しかも PDMS 製マイクロチップは，一度マスターチップを作製してしまえば，コピィは高々100 円/個程度で作製できるため，マクロアクチュエータとマイクロチップ一体型に比べて大幅なコストダウンを図ることができると思われる．

参考文献

[1] Adamo, A., Sharei, A., Adamo, L., Lee, B., Mao, S., and Jensen, K. F., Microfluidics-Based Assessment of Cell Deformability, Analytical Chemistry, 84(15), 6438-6443, 2012.

[2] Anis, Y., Houkal, J., Holl, M., Johnson, R., and Meldrum, D., Diaphragm pico-liter pump for single-cell manipulation, Biomedical Microdevices, 13(4), 651-659, 2011.

[3] Armani, D., Liu, C., and Aluru, N., Re-configurable fluid circuits by PDMS elastomer micromachining, 12th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 222-227, 1999.

[4] Ashkin, A., Dziedzic, J. M., and Yamane, T., Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams, Nature, 330(6150), 769-771, 1987.

[5] Avci, E., Ohara, K., Nguyen, C. N., Theeravithayangkura, C., Kojima, M., Tanikawa, T., et al., High-speed Automated Manipulation of Microobjects Using a Two-Fingered Microhand, IEEE Transactions on Industrial Electronics, 62(2), 1070-1079, 2015.

[6] Bransky, A., Korin, N., Khoury, M., and Levenberg, S., A microfluidic droplet generator based on a piezoelectric actuator, Lab on a Chip, 9(4), 516-520, 2009.

[7] Chronis, N., and Lee, L. P., Electrothermally Activated SU-8 Microgripper for Single Cell Manipulation in Solution, Journal of Microelectromechanical Systems, 14(4), 857-863, 2005.

[8] Fukui, W., Kaneko, M., Kawahara, T., Yamanishi, Y., and Arai, F., Geometrically-constrained cell manipulation for high speed and fine positioning, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2011 (MicroTAS), 2011.

[9] Hagiwara, M., Kawahara, T., Iijima, T., and Arai, F., High-Speed Magnetic Microrobot Actuation in a Microfluidic Chip by a Fine V-Groove Surface, IEEE Transactions on Robotics, 29(2), 363-372, 2013.

[10] 橋本成広, 疋田伸治, 笹田直, せん断流中における赤血球の変形, 日本機械学会論文集(A 編), 59(567), 323-327, 1993.

[11] Hellmich, W., Pelargus, C., Leffhalm, K., Ros, A., and Anselmetti, D., Single cell manipulation, analytics, and label‐free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology, Electrophoresis, 26(19), 3689-3696, 2005.

[12] Henon, Y., Sheard, G. J., and Fouras, A., Erythrocyte deformation in a microfluidic cross-slot channel, RSC Advances, 4(68), 36079-36088, 2014.

[13] Hirose, Y., Tadakuma, K., Higashimori, M., Arai, T., Kaneko, M., Iitsuka, R., Yamanishi, Y., et al., A New Stiffness Evaluation toward High Speed Cell Sorter, 2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), 4113-4118, 2010.

[14] 細川直哉, 寺村薫, 溝上浩司, 高山俊男, 佳宏 蔡, 金子真, ライトトレイル法を用いた PDMS マイクロ流路ゲイン特性の推定, 第 18 回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2656-2657, 2017.

[15] Ito, H., Murakami, R., Tsai, C. H. D., Horade, M., Tanaka, M., and Kaneko, M., Red blood cell deformability upon continuous or repetitive loadings, 2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 141-144, 2017.

[16] Kang, J., Heo, Y. J., Kim, D. S., and Chung, W. K., A Gravity-Actuated Micro-Manipulation Platform for Control of a Micro-Object with Minimal Hardware Setup, 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS), 25-29, 2015.

[17] Kawahara, T., Sugita, M., Hagiwara, M., Arai, F., Kawano, H., Shihira-Ishikawa, I., and Miyawaki, A., On-chip microrobot for investigating the response of aquatic microorganisms to mechanical stimulation, Lab on a Chip, 13(6), 1070-1078, 2013.

[18] 郡慎平, 加藤陽介, 田地川勉, 山本恭史, 板東潔, 単軸引張によるヒト赤血球の変形能の測定: 過度の繰り返し伸展変形が形状回復過程に及ぼす影響, 生体医工学, 53(1), 1-7, 2015.

[19] 溝上浩司, Chia-Hung Dylan Tsai, 金子真, 流体干渉型ハイブリッドアクチュエータによる長時間細胞保持, 第 60 回自動制御連合講演会, FrA1-5, 2017.

[20] Mizoue, K., Phan, M. H., Tsai, C. H. D., Kaneko, M., Kang, J., and Chung, W. K., Gravity-Based Precise Cell Manipulation System Enhanced by In-Phase Mechanism, Micromachines, 7(7), 116, 2016.

[21] 溝上浩司, 寺村薫, Chia-Hung Dylan Tsai, 金子真, kHz オーダーOn-Chip 細胞マニピュレーション, Robomec2017, p241, 2017.

[22] Mizoue, K., Teramura, K., Tsai, C. H. D., and Kaneko, M., Transfer Function of Macro-Micro Manipulation on a PDMS Microfluidic Chip, Micromachines, 8(3), 80, 2017.

[23] Mizoue, K., Yagyu, N., Tsai, C. H. D., and Kaneko, M., Hybrid Actuation for Long-Term Cell Manipulation in a Microfluidic Channel, 2017 IEEE International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM), 1089-1094, 2017.

[24] Mokken, F. C., Kedaria, M., Henny, C. P., Hardeman, M. R., and Gelb, A. W., The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter, Annals of Hematology, 64(3), 113-122, 1992.

[25] Monzawa, T., Kaneko, M., Tsai, C. H. D., Sakuma, S., and Arai, F., On-chip actuation transmitter for enhancing the dynamic response of cell manipulation using a macro-scale pump, Biomicrofluidics, 9(1), 014114, 2015.

[26] Morier, P., Vollet, C., Michel, P. E., Reymond, F., and Rossier, J. S., Gravity‐induced convective flow in microfluidic systems: Electrochemical characterization and application to enzyme‐linked immunosorbent assay tests, Electrophoresis, 25(21‐22), 3761-3768, 2004.

[27] Murakami, R., Tsai, C. H. D., Ito, H., Tanaka, M., Sakuma, S., Arai, F., and Kaneko, M., Catch, Load and Launch toward On-Chip Active Cell Evaluation, 2016 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), 1713-1718, 2016.

[28] Oh, K. W., Lee, K., Ahn, B., and Furlani, E. P., Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy, Lab on a Chip, 12(3), 515-545, 2012.

[29] Otto, O., Rosendahl, P., Mietke, A., Golfier, S., Herold, C., Klaue, D., Girardo, S., et al., Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping, Nature Methods, 12(3), 199-202, 2015.

[30] Sakuma, S., Kuroda, K., Arai, F., Taniguchi, T., Ohtani, T., Sakata, Y., and Kaneko, M., High Resolution Cell Positioning Based on a Flow Reduction Mechanism for Enhancing Deformability Mapping, Micromachines, 5(4), 1188-1201, 2014.

[31] Sakuma, S., Kuroda, K., Kaneko, M., and Arai, F., Realization of 240 nanometer resolution of cell positioning by a virtual flow reduction mechanism, 2014 IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 1031-1034, 2014.

[32] Sakuma, S., Kuroda, K., Tsai, C. H. D., Fukui, W., Arai, F., and Kaneko, M., Red blood cell fatigue evaluation based on the close-encountering point between extensibility and recoverability, Lab on a Chip, 14(6), 1135-1141, 2014.

[33] Tanyeri, M., and Schroeder, C. M., Manipulation and Confinement of Single Particles Using Fluid Flow, Nano Letters, 13(6), 2357-2364, 2013.

[34] Tan, Y., Sun, D., Wang, J., and Huang, W., Mechanical Characterization of Human Red Blood Cells Under Different Osmotic Conditions by Robotic Manipulation With Optical Tweezers, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 57(7), 1816-1825, 2010.

[35] Starzyk, J. A., Jan, Y. W., and Qiu, F., A DC-DC Charge Pump Design Based on Voltage Doublers, IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Fundamental Theory and Applications, 48(3), 350-359, 2001.

[36] Tajikawa, T., Imamura, Y., Ohno, T., Muranishi, F., Kubota, M., and Ohba, K., Measurement and analysis of the shape recovery process of each erythrocyte for estimation of its deformability using the microchannel technique: the influence of the softness of the cell membrane and viscosity of the hemoglobin solution inside the cell, Journal of Biorheology, 27(1-2), 1-8, 2013.

[37] 寺村薫, 細川直哉, 高山俊男, 溝上浩司, 佳宏 蔡, 金子真, PDMS マイクロ流路の硬さは伝達特性にどう影響を与えるのか？, 第 18 回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2658-2659, 2017.

[38] Tsai, C. H. D., and Kaneko, M., On-chip pressure sensor using single-layer concentric chambers, Biomicrofluidics, 10(2), 024116, 2016.

[39] Tsai, C. H. D., Mizoue, K., Kaneko, M., Sakuma, S., and Arai, F., Novel Microfluidic Chip for Extracting Cell Deformability, IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA), 2139-2144, 2015.

[40] Tsai, C. H. D., Sakuma, S., Arai, F., and Kaneko, M., A New Dimensionless Index for Evaluating Cell Stiffness-Based Deformability in Microchannel, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 61(4), 1187-1195, 2014.

[41] Tsai, C. H. D., Sakuma, S., Arai, F., Taniguchi, T., Ohtani, T., Sakata, Y., and Kaneko, M., Geometrical alignment for improving cell evaluation in a microchannel with application on multiple myeloma red blood cells, RSC Advances, 4(85), 45050-45058, 2014.

[42] Tsai, C. H. D., Teramura, K., Mizoue, K., and Kaneko, M., 3000 Hz Cell Manipulation in a Microfluidic Channel, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2968-2973, 2017.

[43] Voldman, J., Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation, Annu. Rev. Biomed. Eng., 8, 425-454, 2016.

[44] Yamada, H., Yoshida, Y., and Terada, N., Blood Cell Counter in Gravity-Driven Microchannel, Japanese Journal of Applied Physics, 44(12R), 8739, 2005.

[45] Yao, B., Luo, G. A., Feng, X., Wang, W., Chen, L. X., and Wang, Y. M., A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting, Lab on a Chip, 4(6), 603-607, 2004.

[46] Yun, H., Kim, K., Lee, and W.G., Cell manipulation in microfluidics, Biofabrication, 5(2), 2200, 2013.

[47] Zhang, K., Liang, Q., Ma, S., He, T., Ai, X., Hu, P., Wang, Y., et al., A gravity-actuated technique for flexible and portable microfluidic droplet manipulation, Microfluidics and Nanofluidics, 9(4-5), 995-1001, 2010.

[48] Zheng, Y., Nguyen, J., Wei, Y., and Sun, Y., Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization, Lab on a Chip, 13(13), 2464-2483, 2013.

付録 A

第 3 章の式(3.1)-(3.3)に対してラプラス変換を行い，時間領域から周波数領域に変換すると式(A1)- (A3)を得ることができる．

$$A_1X_1 = A_cX_c + A_2X_2 \tag{A1}$$

$$pA_c = Ms^2X_c + csX_c + kX_c \tag{A2}$$

$$pA_2 = ms^2X_2 + c_2sX_2 + k_2X_2 \tag{A3}$$

ただし，X_1, X_c, X_2, P(s) は，それぞれアクチュエータの変位，PDMS チップの変形，細胞位置，圧力のラプラス変換を表し，s はラプラス演算子を表している．代数方程式(A1)- (A3)から，入力X_1に対する出力 X_2の関係を求めると式(A4)が得られる．

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{A_1}{A_2} \frac{Ms^2 + cs + k}{\left\{\left[M + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 m\right]s^2 + \left[c + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 c_2\right]s + \left[k + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 k_2\right]\right\}} \tag{A4}$$

式(A4)は，第 3 章 Fig 3.3 の細胞マニピュレーションシステムのアクチュエータの位置入力に対する細胞の位置出力を示す伝達関数である．図 2 の伝達関数の物理的意味をもう少し詳しく調べるために，極限的なケースを二つ考えてみよう．一つは周波数が極端に低い場合で s→0 に相当する，もう一つは周波数が極端に大きい場合で s→∞に相当する．

s→0 の場合，式(A4)は式(A5)に収束する．

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{A_1}{A_2} \frac{k}{k + \left(\frac{A_c}{A_2}\right)^2 k_2} \tag{A5}$$

もし，マイクロ流路出口が大気に開放されていれば，$k_2 = 0$となり，式(A5)は式(A6)のように単純な式になる．

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{A_1}{A_2} \tag{A6}$$

一般にアクチュエータの断面積はマイクロ流路の断面積に対して約百万倍大きいため，ゆっくりアクチュエータを 1μm 動かした場合，マイクロ流路内の細胞は単純に見積もって 1m も動いてしまう．一方，もしマイクロ流路出口が完全に塞がれて流体が流出できない場合，アクチュエータが駆動されてもマイクロ流路内の細胞は動くことはできない．したがって，アクチュエータの動きは PDMS の変形x_cによって吸収される．マイクロ流路壁部が動けない状態になっている場合，k_2→∞となる．この場合，式(A5)は式(A7)に帰着する．

$$\frac{X_2}{X_1} = 0 \tag{A7}$$

次に s→∞の場合を考えてみよう．物理的な意味としては，この条件はアクチュエータの入力周波数を無限に大きくした場合に相当する．この場合，アクチュエータ入力に対する細胞位置を表す伝達関数は式(A8)となる．

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{A_1}{A_2}\frac{M}{M + \frac{A_c}{A_2}^2 m} \tag{A8}$$

一般に，マイクロ流路内の体積は PDMS マイクロチップとアクチュエータ間チューブの体積に比べると無視できるほど小さいため，マイクロ流路の流体の慣性は無視できると考えられる．すなわち m=0．この条件下では式(A8)は式(A6) $X_2/X_1 = A_1/A_2$ に帰着し，結果的に入出力比は面積比だけで決まる．この物理的な意味は次のように考えることができる．入力周波数が無限に高くなると，慣性を持った PDMS 壁部は見かけ上剛体壁のように振る舞う．つまり PDMS 壁部のバネ質量系は周波数に対してローパスフィルターのように振る舞う．

次に m=0 を仮定しない一般的な振る舞いについて考えてみよう．入力周波数が零点にヒットすると，式(A4)のゲインがゼロになるため，マイクロ流路内の細胞は動かない．一方，入力周波数が極にヒットすると，式(A4)の分母がゼロになるため，マイクロ流路内の細胞の振動振幅は極端に大きくなり，制御できなくなる．

正弦波入力に対する出力応答のゲインを調べたい場合，伝達関数に s=jω を与えて，G(jω)を求め，さらに |G(jω)| を導出すればよい．

$$\mathrm{G(j\omega)} = \alpha\frac{(\omega_1^2 - \omega^2) + j(2\zeta_1\omega_1\omega)}{(\omega_2^2 - \omega^2) + j(2\zeta_2\omega_2\omega)} \tag{A9}$$

式(A9)よりゲイン関数を導出することができる．

$$\begin{aligned}|\mathrm{G(j\omega)}| &= |\alpha|\frac{|(\omega_1^2 - \omega^2) + j(2\zeta_1\omega_1\omega)|}{|(\omega_2^2 - \omega^2) + j(2\zeta_2\omega_2\omega)|} \\ &= \alpha\sqrt{\frac{\omega^4 + \{(2\zeta_1^2\omega_1)^2 - 2\omega_1^2\}\omega^2 + \omega_1^4}{\omega^4 + \{(2\zeta_2^2\omega_2)^2 - 2\omega_2^2\}\omega^2 + \omega_2^4}}\end{aligned} \tag{A10}$$

本博士論文に直接関連した研究業績

査読付きジャーナル論文

【1, 3, 7, 8 章に関連】

1. Mizoue, K., Teramura, K., Tsai, C. H. D., and Kaneko, M., Transfer Function of Macro-Micro Manipulation on a PDMS Microfluidic Chip, Micromachines, 8(3), 80, 2017.

【1, 6, 8 章に関連】

2. Mizoue, K., Phan, M. H., Tsai, C. H. D., Kaneko, M., Kang, J., and Chung, W. K., Gravity-Based Precise Cell Manipulation System Enhanced by In-Phase Mechanism, Micromachines, 7(7), 116, 2016.

査読付き国際会議論文

【1, 4 章に関連】

1. Tsai, C. H. D., Teramura, K., Mizoue, K., and Kaneko, M., 3000 Hz Cell Manipulation in a Microfluidic Channel, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2968-2973, 2017.

【1, 5, 8 章に関連】

2. Mizoue, K., Yagyu, N., Tsai, C. H. D., and Kaneko, M., Hybrid Actuation for Long-Term Cell Manipulation in a Microfluidic Channel, 2017 IEEE International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM), 1089-1094, 2017.

【2 章に関連】

3. Tsai, C. H. D., Mizoue, K., Kaneko, M., Sakuma, S.,and Arai, F., Novel Microfluidic Chip for Extracting Cell Deformability, IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA), 2139-2144, 2015.

国内学会講演論文

【1, 7, 8 章に関連】

1. 寺村薫, 細川直哉, 高山俊男, 溝上浩司, 佳宏 蔡, 金子真, PDMS マイクロ流路の硬さは伝達特性にどう影響を与えるのか？, 第 18 回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 2658-2659, 2017.

【1, 4 章に関連】

2. 溝上浩司, Chia-Hung Dylan Tsai, 金子真, 流体干渉型ハイブリッドアクチュエータによる長時間細胞保持, 第 60 回自動制御連合講演会, FrA1-5, 2017.

【1, 4, 8 章に関連】

3. 溝上浩司, 寺村薫, Chia-Hung Dylan Tsai, 金子真, kHz オーダーOn-Chip 細胞マニピュレーション, Robomec2017, p241, 2017.

その他の業績

査読付きジャーナル論文

1. 舩井皓平, 溝上浩司, 東森充, 金子真, アクティブストロボイメージャの最適パラメータ設計, 計測自動制御学会論文集, vol.46, no.12, pp.791-796, 2010.

査読付き国際会議論文

1. Tsai, C. D., Phan, M. H., Mizoue, K., and Kaneko, M., Unexpected Beads Alignment in a Microfluidic Channel, IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS), 5143-5148, 2016.

2. Funai, K., Mizoue, K., Higashimori, M., and Kaneko, M., Empirical Based Optimal Design of Active Strobe Imager, Proc. of the IEEE/RSJ Int. Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS), 1896 – 1901, 2010.

国内学会講演論文

1. 伸澤佑一, 溝上浩司, 金子真, 脳波源推定問題における電極配置の外心分離法の提案, 日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 2012(24), "7D16-1"-"7D16-2", 2012-01-06.

2. 長瀬功児, 溝上浩司, 金子真, α波相殺・誘発電位強調法と閉眼圧覚刺激への応用, ロボティクス・メカトロニクス講演会講演概要集 2011, "2P2-L10(1)"-"2P2-L10(2)", 2011-05-26.

3. 吉川修平, 伸澤佑一, 溝上浩司, 金子真, 聴覚刺激誘発電位は実時間計測可能か？, 第 12 回システムインテグレーション部門講演会, pp0553-0554, 2011.

4. 伸澤佑一, 溝上浩司, 金子真, 脳波源推定における外心分離電極配置の提案, 第 12 回システムインテグレーション部門講演会, pp0555-0558, 2011.

5. 伸澤佑一, 則定孝彰, 溝上浩司, 東森 充, 金子 真, 閉眼触覚集中時に現れる脳波とその評価, ロボティクス・メカトロニクス講演会講演概要集 2010, "1A1-G29(1)"-"1A1-G29(2)", 2010.

6. 則定孝彰, 伸澤佑一, 長瀬功児, 溝上浩司, 多田隈建二郎, 東森充, 金子真, チャンネル間の位相特性に着目した新しい事象関連電位抽出法, 第 28 回日本ロボット学会学術講演会予稿集, 1H1-2, 2010.

7. 溝上浩司, 金子真, 位相平面ノイズ評価機能を備えた脳波計の開発, 第 10 回計測自動学会システムインテグレーション部門講演会予稿集, 1C1-05, 2009.

8. 則定孝彰, 伸澤佑一, 溝上浩司, 東森充, 金子真, 集中時に脳から送られるメッセージ, 第 10 回計測自動学会システムインテグレーション部門講演会予稿集, 1C1-06, 2009.

9. 伸澤佑一, 則定孝彰, 溝上浩司, 東森充, 金子真, 脳波と触覚弁別閾値との相関, 第 10 回計測自動学会システムインテグレーション部門講演会予稿集, 1C1-07, 2009.

10. 伸澤佑一, 則定孝彰, 溝上浩司, 東森充, 金子真, α波は集中的触動作時にも現れる　－事実の検証－, 第 27 回日本ロボット学会学術講演会予稿集, 2L2-04, 2009.

11. 則定孝彰, 伸澤佑一, 溝上浩司, 東森充, 金子真, α波は集中的触動作時にも現れる　－ダイナミック信号処理による考察－, 第 27 回日本ロボット学会学術講演会予稿集, 2L2-05, 2009.

12. 溝上浩司, 金子真, 位相平面ノイズチェッカー内蔵型脳波計の開発, 第 27 回日本ロボット学会学術講演会予稿集, 2L2-03, 2009.

特許

1. 溝上浩司：赤血球変形能測定方法，公開日平成 20 年 3 月 21 日.

2. 溝上浩司，米村紹芳，小池康晴，キム ドンオク，キム ヤンドン：超音波モータの制御装置，該方法，該プログラム及び記録媒体並びに超音波モータシステム，特許公開 2008-67441，公開日平成 20 年 3 月 21 日.

3. 辻敏夫，柴建次，吉栖正，東幸仁，三成貴浩，寺尾譲，溝上浩司，小西高志：血管粘弾性測定装置，血管粘弾性測定方法，プログラム，コンピュータ読み取り可能な記録媒体，大規模集積回路及び FPGA，特許公開 2008-272387，公開日平成 20 年 11 月 13 日.

4. 溝上浩司，金子真：分析装置，分析方法，国際公開番号　PCT/JP2012/069412，公開日平成 26 年 2 月 6 日.

5. 高田宣昭，溝上浩司，横山裕也：隙間センサ，特許公開 2017-142110，公開日平成 29 年 8 月 17 日.

6. 溝上浩司：端末操作，プログラム，特願 2017-059607.

解説

1. 溝上浩司: 組込み技術を核としたベンチャー企業の取組み,電気学会誌, Vol.127, No.10, p.676(2007-10).
2. 溝上浩司: 電子技術系ベンチャー企業から見たロボット産業への期待, 日本ロボット学会誌 Vol.25, No.1, pp.63-64, 2007.

受賞

1. 公益財団法人 ひろしまベンチャー育成基金よりひろしまベンチャー奨励賞銀賞受賞, 2009 年 03 月.
2. Embedded Technology 2009 にて JASA 特別賞受賞(中国地域組込みシステムフォーラムの一員として) 2009 年 11 月.

謝辞

2009 年に金子・東森研究室でマイクロ流体チップを用いて細胞の硬さ計測を行うというプロジェクトがスタートし，このプロジェクトの立ち上げを担われたのが廣瀬優紀君と金子真教授でした．当初はマイクロ流体チップの作り方から勉強し，この分野での先駆者であられる新井史人先生（現名古屋大学教授）及び山西陽子先生（現九州大学教授）に強力なサポートをいただいたと伺っています．その後，名古屋大学の佐久間臣耶先生（現名古屋大学助教）にアドバイスをいただきながらマイクロ流路が製作できるようになり，2011 年に福井航君が始めた細胞ストレス試験で，外部マクロアクチュエータを用いた能動方式がスタートし，一気に研究が加速したように思います．その後，ポスドクとして当該研究室に滞在された佐久間臣耶先生が，PDMS マイクロチップ内の弾性の存在が能動方式の細胞マニピュレーションの高分解能化に大きく貢献していることを高速カメラ映像によって捉え，マイクロチップ外にマクロアクチュエータを設置しても細胞位置決め精度が保証されることを実験的に突き止めてられたことを Lab-on-a-Chip で知りました．本研究は当該研究室に在籍された学生さん，先生方の研究成果を勉強させていただいた中で，マイクロ流体チップのオープンループ特性が未だ十分明らかにされていないという点が分かり，スタートさせました．これらの先行研究無くして，本博士論文は到底完成させることができなかったと思っております．ここまでの先行研究でわたしに大きな道筋を作ってくださった廣瀬優紀君，福井航君，新井史人教授，山西陽子教授，佐久間臣耶助教に心より感謝申し上げます．

また本研究を実際に遂行する中では，特に実験においてお手伝いをいただいた M. H. Phan 君，柳生尚紀君，寺村薫君にも心よりお礼申し上げます．特に寺村薫君には，本論文をまとめる段階で大変お世話になったことをここに感謝の気持ちを込めて付記しておきます．

一方，英語論文の執筆では構成，文法を含め，当該研究室に特任講師として在籍しておられた Dylan Tsai 先生（現 National Chiao Tung University 助教）には言葉では言い尽くせないほどお世話になってしまいました．この場を借りて深謝申し上げたいと思います．

さらに，金子真教授には，社会人博士課程として 3 年間にわたり，テーマ設定，ゴールの設定，実験方法，実験結果，さらに論文のまとめ方に対して一貫して暖かいご指導をいただき，本当にありがとうございました．心よりお礼申し上げます．タイトルのつけ方やタイトルの中に新しいキーワードを必ず入れるべきという金子教授の考え方は大変勉強になりました．ベンチャー企業の社長として会社の仕事をしつつ，研

究を進めることのむつかしさを十分理解していただいた上での適切なアドバイスがしっかり脳裏に焼き付いています.

最後に，博士論文審査に対して，貴重なご助言をいただいた大須賀公一教授，山田克彦教授にもこの場を借りて深くお礼申し上げます.

3年間という短い期間ではございましたが，先生方からいただいたアドバイスを胸に刻み込んで，今後の会社の技術開発にも役立ていきたいと思います．さらに先生方からいただいた丁寧なご指導に報いるためにも，今後は日本の将来を見据えた若手技術者の育成といった社会貢献にも取り組んでまいりたいと思います.